



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO MORFOLOGICO, FISIOLÓGICO Y ULTRA-
ESTRUCTURAL DE Microsporium canis Y UNA
POSIBLE CEPA VARIANTE DE ESTE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

REBECA GEORGINA MANNING CELA

BAJO LA DIRECCION DE:
PhD. ROBERTO ARNULFO CERVANTES OLIVARES

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1989

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

	Pag.
I. REBUMEN.....	1
II. LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
III. INTRODUCCION.....	4
-Generalidades.....	4
-Epidemiología.....	10
-Patogenia.....	14
-Ataque a la queratina.....	15
-Factores predisponentes.....	17
-Cuadro clínico.....	17
-Diagnóstico.....	19
1. Examen directo.....	19
2. Cultivo.....	20
-Tratamiento.....	20
A. Tópico.....	20
B. Sistémico.....	21
-Comparación del microscopio de luz, con el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión.....	23
IV. OBJETIVO.....	27
V. MATERIALES Y METODOS.	
MATERIALES.....	28
-Material Biológico.....	28
-Soluciones y reactivos.....	28
-Medios de cultivo.....	29
-Equipo.....	31
-Material fotográfico.....	31
METODOS.....	31
-Processamiento de la muestra clínica (para diagnóstico y aislamiento de las cepas).....	31
A. Examen microscópico directo (técnica del KOH al 10 % o 20%).....	31
B. Cultivo en medios selectivos (técnica de picadura).....	32
C. Almacenamiento.....	32
-Análisis macroscópico de las cepas.....	33
-Análisis microscópico de las cepas.....	33
A. Tinción con azul de algodón-lactofenol.....	33
B. Técnica de microcultivo.....	34
-Mantenimiento de las cepas.....	36
-Crecimiento en medio de cultivo pobre.....	36
-Crecimiento en medio de cultivo ricos.....	37
-Processamiento de las muestras para microscopía electrónica de barrido.....	38
-Processamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.....	40
A. Tinción negativa.....	40
B. Inclusión, obtención de cortes semifinos y ultrafinos; y tinción de Reynolds.....	41
-Aislamiento de partículas virales del sobrenadante de <u>M. canis dysgonico</u> , y su transferencia a cultivos de <u>M. canis</u> en desarrollo en medio SDI.....	42
VI. RESULTADOS.....	44

VII. DISCUSION.....	76
VIII. CONCLUSIONES.....	94
IX. BIBLIOGRAFIA.....	95

I. RESUMEN.

Microsporium canis es un hongo queratinolítico, zoofílico, causante de tiñas en animales y humanos; cuyo estadio perfecto se conoce con el nombre de Nannizzia ottae. Sabouraud en 1910 describió la presencia de cepas anormales de M. canis y a partir de esa fecha han sido cada vez más frecuentes los reportes de estas cepas, al grado que en 1981 se reporta que estas representan la tercera parte del total de los aislamientos de M. canis en un estudio epidemiológico hecho en Gran Bretaña de 1966 a 1977. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio de Microsporium canis dysgónico para intentar su correcta clasificación dentro del género Microsporium, como una posible variante de M. canis. Para ello se realizó un análisis macroscópico y microscópico de M. canis y M. canis dysgónico durante su desarrollo y a través de varias resiembras en medio SDA y medio de arroz. Se estudió su comportamiento macro y microscópico en diferentes condiciones nutricionales. Se analizaron ambas cepas por Microscopía electrónica de barrido y transmisión. Finalmente se estudió el comportamiento de la cepa de M. canis a la que se le agregó, durante su desarrollo en cultivo líquido, partículas virales aisladas y purificadas de la cepa de M. canis dysgónico. Se encontró que M. canis dysgónico es muy inestable en cultivo y da origen a una cepa con características intermedias entre estas dos cepas, denominada cepa atípica de M. canis. El análisis de las cepas bajo diferentes condiciones nutricionales indicó que no fue éste un factor que influyera o determinara las alteraciones vistas en M.

canis dysgónico y cepa atípica de M. canis; los requerimientos nutricionales de las 3 cepas son diferentes, encontrando que el desarrollo de M. canis dysgónico depende principalmente de fuentes protéicas, mientras que la cepa típica y atípica de M. canis de carbohidratos, y que la diferente sensibilidad a distintas sustancias y concentraciones de las mismas además de las variaciones en la producción de pigmento excretado al medio indican diferencias significativas en su bioquímica.

Se encontraron partículas virales en el sobrenadante del medio de cultivo y parasitando las cepas de M. canis dysgónico y cepa atípica de M. canis. La cepa de M. canis fue negativa a la presencia de partículas virales. La transferencia de estas partículas virales a cultivos de M. canis en desarrollo dio origen a cepas con características propias de cepa atípica de M. canis demostrando, que estos virus son la causa de las alteraciones vistas en M. canis dysgónico (y cepa atípica de M. canis, originada por su inestabilidad en cultivo), permitiendo clasificar a ésta como cepa variante de M. canis y no como una cepa de diferente especie.

II. LISTA DE ABREVIATURAS.

- OPA.-Olcusa-Peptona-Agar.
- MEB.-Microscopio Electrónico de Barrido.
- MET.-Microscopio Electrónico de Transmisión.
- MO.-Microscopio Óptico.
- BDA.-Sabouraud-Dextrosa-Agar.
- BDC.-Sabouraud-Dextrosa-Caldn.
- BDL.-Sabouraud-Dextrosa-Líquido.

III. INTRODUCCION.

GENERALIDADES.

MICROSPORIUM CANIS es un hongo que puede afectar los tejidos queratinizados, como piel, cabello y uña. Es un hongo no dimórfico, el cual se presenta en las lesiones cutáneas afectadas, como hifas septadas y artrosporas. Sin embargo, en cultivos aparecen estructuras diferenciadas que resultan útiles para su clasificación.

Se presenta como la causa mas común de tiñas en gatos y perros en el mundo, siendo primordialmente un patógeno animal, por lo que esta dentro del grupo de los llamados hongos "Zoofilicos" (2). Aunque los animales son los huéspedes naturales para este grupo de hongos, las infecciones animales son transmitidas frecuentemente a humanos, principalmente a niños. Presenta una distribución geográfica mundial. Se ha encontrado su estadio perfecto, al que se le conoce con el nombre de Nannizzia nia (8, 12, 26).

Presenta características macro y microscópicas típicas de su especie, cuando es sembrado en medios Sabouraud-Dextrosa-Agar (SDA) en el que tiene un periodo de incubación de 5 a 10 días, obteniéndose un crecimiento adecuado en una semana. Desarrolla características macroscópicas tales como colonias mas o menos planas; por el frente es de color blanco, crema, canela o marrón; y por el reverso desde un color amarillo intenso hasta un color naranja; su superficie puede ser de apariencia algodonosa, lanosa, aterciopelada o de ante, con borde radiado (2, 8, 16, 21, 47). En Papa-Dextrosa-Agar, el pigmento es amarillo intenso y

desarrolla rápidamente micelio aéreo (47).

Microscópicamente presenta microconidias escasas que varían de claviformes a piriformes, miden de 2,5-3,5 a 4,7 μ m; las macroconidias presentan forma de huso con pared gruesa y punta fina con espículas (membranas), con 7-15 células o septos, miden 15-20x60-125 μ m y a μ m de espesor en su pared se observa una mayor producción de estas cuando el hongo es sembrado en medio de arroz hervido (51); también se observan hifas en forma de raqueta, pectinadas, con hondonaciones y clamidosporas (9, 16, 21).

Cepas anormales de *M. canis* fueron descritas desde 1910 y a partir de esta fecha subsiguientes reportes describen el aislamiento cada vez más frecuente de estas cepas (17, 18, 19, 34, 42). Según English (18), Walker (42) observó que algunas cepas anormales varían solamente en la pigmentación normal de *M. canis*, en otros casos se reporta que no presentan pigmentación (42, 47), o que como según English (18), Walker (42) reporta que otras presentan un crecimiento muy lento y un período de vida corto. Finalmente otras además de algunas de las características anteriores, no producen micelio aéreo (17, 19, 42) o producen macroconidias deformes o hifas reflexivas provenientes de cepas que fueron inestables tanto en los aislamientos primarios como en los subcultivos (17, 18). Estas cepas en algunas ocasiones se han definido con el nombre de *M. canis dysgénica*, un término que según English (18) fue acuñado por Ainsworth (1) y que significa cultivo de lento crecimiento (17, 19) en otras según English (18), Taylor (58) y Carter (10) entre otros, la describen con el

nombre de cepa atípica de M. canis y finalmente como cepa lampiña de M. canis (42); sin embargo aun cuando la descripción de su morfología no es exactamente igual y cada una tiene características particulares que las diferencian y clasifican con diferente nombre, si presentan características que sugieren se trata del mismo hongo; como por ejemplo, la bifurcación reflexiva de la hifa entre otras características (17, 18, 34, 42). Se han clasificado dentro del género Microsporium debido a que sus características macro y microscópicas corresponden a este género, presentando mayor similitud con M. canis.

En 1977 en Philadelphia, Kyung Jou Kwon-Chung y Cols (34) reportan el aislamiento de 11 cepas que presentaron cultivos semejantes a los de M. canis pero cuyas características coloniales y morfológicas difieren de las encontradas comunmente en estas cepas. El primocultivo del hongo en medio SDA+cloromicetina y ciclohexamida dieron colonias planas profundamente sumergidas en el medio y sin micelio aéreo después de una semana, a la siguiente semana se observaron de color amar con un mechón grisáceo en el centro. Algunas cepas desarrollaron un pequeña cantidad de micelio aéreo pero la mayoría permanecieron lampiñas y verosas. Después de 3 semanas las colonias se tornaron a un color marrón al igual que el reverso de éstas, y las dos semanas siguientes los cultivos se acumularon y formaron pliegos radiales profundos, diferentes a los cultivos de la cepa control de M. canis, además de presentar un crecimiento mucho mas lento que la cepa control. Microscópicamente encontraron hifas reflexivas parecidas a las de

Trichophyton soudanense. Después de unas semanas de crecimiento en SDA se presentaron muchas macroconidias en forma de huso y pared gruesa parecidas a las de M. canis pero mas cortas, algunas presentaban formas crecientes, mas angostas y con pocos septos. La cantidad de macroconidias era menor que en los aislamientos de M. canis en los mismos medios. En otros medios como el de Lowenstein, Vanbrughem, entre otros. También encontraron notables diferencias en la morfología colonial entre M. canis y M. canis dysgénico. Estudios detallados de una de estas cepas denominada 901, que se resembró por dilución con la finalidad de separar las hifas reflexivas de las otras con características parecidas a la cepa normal de M. canis, encontraron que a pesar que la cepa 901 mostró un solo tipo de morfología colonial se obtuvieron dos cepas diferentes a la 901, una de las cuales (901C) mostró una morfología colonial propia de M. canis y producía macroconidias e hifas iguales a la cepa control; y la otra (901 D) dio origen a una colonia amarilla con abundante micelio aéreo y en cuyo análisis microscópico mostró la presencia de un micelio tipo coral, abundantes microconidias piriformes y macroconidias distorsionadas que no corresponden a las formas características de M. distortum ni a M. canis si no a una forma intermedia entre estas. Al sembrar 901C y 901D nuevamente juntas produjo una cepa sin pigmento y no mostró la presencia de hifas reflexivas confundiendo aun mas una posible explicación de la relación de estas dos cepas (34).

Posteriormente en 1978 describen el aislamiento de 4 cepas de M. canis atípicas en el noroeste de Londres cuyas principales

características fueron; presentar un color marrón que sustitua el color amarillo común, un micelio con apariencia de pluma de ave profundamente sumergido en el medio, macroconidias enanas o distorsionadas que pueden estar cubiertas de grandes ampollas y un crecimiento mas lento que la cepa normal (18). En el mismo año describieron detalladamente las características de 4 cepas de M. canis dysgónico, cuyas colonias consisten de fascículos de hifas muy anchos con pequeños compartimentos y ramificaciones estrechas; las bifurcaciones laterales son cortas y algunas no se ramifican. Se observan hifas reflexivas además de 3 tipos de micelios: el dysgónico, aparentemente normal y una forma intermedia entre los 2, distinguiendose cambios de uno a otro de manera cíclica, en donde la transición de dysgónico a aparentemente normal es de manera brusca mientras que la dirección contraria es de modo gradual. Las cepas fueron extremadamente inestables tanto en los primocultivos como en los subcultivos. Las colonias fueron de color marrón con textura aterciopelada y se obtuvieron de 2 tipos, planas y de apariencia de pluma de ave sin presentar micelio aéreo y con un crecimiento mas lento que la cepa control de M. canis. Se hicieron diluciones con solución salina de la hifa del hongo de diferentes partes de la colonia y se resembraron en Glucosa-Peptona-Agar (GPA) obteniendo cultivos nuevamente dysgónicos en algunos casos, en otras cepas atípicas de M. canis y en otras cepas normales de M. canis (17). En 1979 efectuaron la infección experimental de cuyes con cepas típicas y atípicas de M. canis y M. canis dysgónico. Como la esporulación y viabilidad varía entre las cepas, el

inóculo consistió de una suspensión de fragmentos del hongo en una cantidad viable conocida. Cuando se usó una cantidad de inóculo adecuada, se obtuvieron lesiones y pelos fluorescentes bajo la lámpara de Wood, en todos los casos excepto en uno. Las lesiones obtenidas en los cultivos fueron iguales tanto en la cepa típica y atípica de M. canis como en la de M. canis dysgonico. En cada caso las cepas inoculadas fueron resaisladas de las lesiones en cultivos puros mostrando características de la cepa original (19).

Finalmente en 1981 se describe la morfología macro y microscópica de M. canis dysgonico como colonias lampiñas que alcanzan rápidamente un diámetro de 30-35 mm en 10 días a 26-28 °C, que es ligeramente menor que M. canis. La textura aunque serosa, es blanda y la superficie de color antr, amarillo o gris. La característica de difundir pigmento amarillo en el reverso de los cultivos típicos de M. canis puede presentarse en colonias jóvenes, pero la mayoría de éstas son no pigmentadas. Un crecimiento tipo coral se forma en la periferia del cultivo, que está parcialmente sumergido en el medio. Algunos de los aislamientos son inestables, revirtiendo a la forma típica de la especie, inmediatamente en el cultivo primario o después de varios pases, pudiendo producirse una forma intermedia en este proceso. Básicamente no hay macroconidias en la fase lampiña en SDA, pero presenta como característica distintiva las ramificaciones reflexivas del micelio, mientras que en medio de arroz hervido produce macroconidias típicas de M. canis(42).

EPIDEMIOLOGIA.

M. canis es la causa mas común de tiñas en gatos y perros en el mundo. En el Centro de Enfermedades Transmisibles, durante la inspección de tiñas en animales encontraron que el 97% de tiñas en gatos y el 66.5% de tiña canina, la infección fue producida por M. canis. Este hongo es tambien el causante de tiña en caballo, monos, simios y chinchillas. Aunque algunos animales presentan lesiones obvias, la infección a menudo es minima o asintomática, por lo que es difícil de detectar (2, 8, 28, 47).

Las infecciones en humanos por M. canis son comunes en el área rural y comunidades urbanas, en donde los gatos y perros, particularmente cachorros, son los transmisores mas importantes de esta infección. Este tipo de tiñas es mas frecuente en niños, debido a la falta de ácidos grasos en el cuero cabelludo (14).

Infecciones en humanos primariamente adquiridas de perros y gatos pueden ser transmitidas por contacto a otro humano, sin embargo epidemias extensivas por transferencia humano a humano no son comunes. Pueden ser observados grupos de infecciones en una familia, en estrecho contacto, pero, es difícil determinar si hubo un único foco de infección o si el contagio ocurrió de humano a humano.

Muchos estudios de tiña capitis en niños de Estados Unidos indican que del 8 al 10% son debidos a M. canis; sin embargo, algunos reportes indican una prevalencia de 50 a 65% en algunas áreas. La prevalencia de infecciones por este hongo en humanos en la comunidad probablemente refleja la prevalencia de la enfermedad en perros y gatos de la misma. Las lesiones en gatos

comunmente pasan desapercibidas, debido a que con gran frecuencia las esporas de este dermatofito estan presentes en el pelo de estos animales en estado saprófito. Se han observado que los gatos finos, especialmente los de raza Persa, son los mas afectados además de ser común que se encuentren infectados en los establecimientos de venta. Se ha comprobado que entre los cachorros, la contaminación llega al 80% y en la búsqueda de casos humanos se verificó que el 64% de los mismos se debía al contagio de gatos que se encontraban en las casas de los pacientes. En los perros las lesiones son mas evidentes (2, 4, 63).

Se ha observado que los hongos provenientes de animales son muy agresivos, cuando se instalan en el hombre; pero cuando los pases se van haciendo a través de diferentes personas el hongo pierde agresividad y las lesiones que produce son insignificantes o casi nulas; en estos casos se ha visto que la menor agresividad se ve compensada por la mayor tenacidad y persistencia del hongo, por lo que no puede ser eliminado con facilidad y requiere de un severo tratamiento (8, 28, 63).

La dinámica de la incidencia de este dermatofito como la causa de tiñas, alrededor del mundo, fluctúa grandemente como puede verse en el siguiente estudio cronológico:

Antes de 1960 fue el agente etiológico principal de tiña capitis en Cuba, Puerto Rico, Argentina, Chile, Uruguay, Dinamarca, Finlandia, Francia, Gran Bretaña, Islas del Cabo Verde, Australia y Nueva Zelanda; sin embargo en 1984 se observó que M. audouini reemplazó a M. canis como agente dominante de

tiña cápitis en E.U. (52). En una investigación mundial hecha de 1960 a 1970 M. canis como agente causal de tiña cápitis, representó el 26% en Africa, 57% en America Latina, 75% en Australia y 33.6% en Europa (52). En otra investigación mundial publicada en 1978 reportan a M. canis como el agente dominante en tiña cápitis en Chile, Brasil y Uruguay (52). De 1968 a 1979 fue la principal causa de tiña cápitis en Kuwait (52), de 1963 a 1972 de Australia (3) y de 1972 a 1977 de Italia, en donde además de ser el principal agente causal de tiña cápitis también lo fue de tiña corporis (9). Por otro lado en España de 1973 a 1976 reportan una baja incidencia de tiñas causadas por M. canis alcanzando solo el 2.6% del total de los aislamientos (61). En el estado de Arizona; este hongo comprende el 20.7% del total de los dermatofitos aislados produciendo en la mayoría de los casos tiña cápitis; en contraste con otros estados de U.S.A. donde T. tonsurans fue la principal causa de tiña cápitis (52). En 1975 se reportó la primer epidemia de tiña en Eilat, Israel; encontrando en un periodo de 9 meses 78 casos diagnosticados de tiña cápitis causada por M. canis, en donde el 85% de los pacientes afectados fueron niños de 5 a 14 años de edad (15). La prevalencia de tiñas de 1975 a 1979 en Nueva Zelanda; el 31.1% de los casos que se encontraron principalmente en niños, fueron causados por M. canis que fue el segundo en frecuencia después de T. rubrum que representó el 35.8% de los casos. En México el 30% de los casos de tiña cápitis es causada por M. canis (60).

Como se dijo anteriormente los reportes de aislamientos de cepas anormales de M. canis a partir de 1910 son cada vez mas

frecuentes. En 1981, se realizó un estudio epidemiológico para conocer la incidencia de M. canis y M. canis dysgónico en el Área de Londres y sus alrededores; encontrando que la incidencia de tiñas aumentó considerablemente durante el periodo de 1962-1974, en donde M. audouini fue la especie mas común en los primeros años; posteriormente en 1970, esta prevalencia disminuye y el número de casos debidos a M. canis aumenta alcanzando hasta un 90% en 1974. Aun cuando la incidencia de la enfermedad posteriormente disminuye, M. canis continúa como la principal responsable de tiña cápitis diagnosticada en el Laboratorio ST.John de Londres en 1977. Un solo caso de cepa lampiña de M. canis fue aislado en 1963 en este laboratorio, aumentando considerablemente el número de aislamientos a partir de 1966 hasta alcanzar en 1977 un 40% de los cultivos de M. canis, lo que representa una tercera parte de todos los aislamientos de tiña cápitis causadas por este hongo. M. canis prevaleció en el Norte y Este de Londres y la cepa lampiña de este en el Sur y Oeste (42). Lo anterior permite ver el aumento de la incidencia de M. canis dysgónico, lo que sugiere que probablemente seguirá aumentando, alcanzando porcentajes más altos en relación M. canis y tal vez a otras especies (42).

M. canis dysgónico probablemente se encuentre distribuido en otras partes del mundo, pero por falta de informes de los aislamientos, o tal vez por falta de diagnostico adecuado, no se podrá en corto tiempo saber con precisión la prevalencia y distribución de este hongo a nivel mundial.

PATOGENIA.

Las tiñas producidas por M. canis son contagiadas principalmente por gatos y perros. Las lesiones en gatos pasan comunmente desapercibidas, debido a que con frecuencia las esporas de este dermatofito estan presentes en el pelo en estado saprófito (63).

En humanos M. canis produce principalmente tiña cápitis; que es la infección fúngica del cuero cabelludo y sus anexos, presentando dos variedades: a) Seca y b) Húmeda. En menor grado produce tiña corporis; que es la tiña que afecta a la piel lampiña de cualquier sitio del cuerpo, pudiendo presentarse en forma generalizada o localizada. Y por último pueden producir tiña unguis u onicomycosis.

Las lesiones causadas por M. canis dysgénico y cepas atípicas de M. canis; tanto en animales como en humanos, presentaron las mismas características que las descritas para M. canis (19, 34, 42). En 1981 se reportó el aislamiento de cepas lampiñas de M. canis, de infecciones naturales en gatos y perros, preferencialmente de cachorros; así como de lesiones en humanos, principalmente de cuero cabelludo (Tiña cápitis) y secundariamente de escamas lampiñas (tiña corporis) (42). En 1977 reportan 11 casos de tiña causados por cepas variantes de M. canis; de las cuales la mayoría fue debida a tiña corporis y en menor grado a tiña cápitis (34) y en 1979 efectuaron la infección experimental de cuyes con cepas de M. canis y M. canis dysgénico; encontrando que este último producía lesiones con las mismas características que la cepa normal de M. canis (19).

ATAQUE A LA QUERATINA.

Por medio de las observaciones clínicas y experimentales, se ha podido establecer la predilección de los dermatofitos por la epidermis, por ejemplo; cuando arthrosporas (fragmentos miceliales de dermatofitos) se inyectan intravenosamente a cobayos, no se desarrollan lesiones, pero si se producen excoriaciones en el área de la piel donde se colocó la inyección; en la zona escarificada aparece varias semanas después una infección dermatofítica (14). En 1982 se demostró la actividad proteolítica de una proteína extracelular (Queratinasa) de M. canis; que es inducida al cultivar una cepa de este hongo en Sabouraud-Dextrosa-Caldn (SDC) en presencia de pelo de humano, mientras que la actividad proteolítica de esta proteína no fue detectada en medio de cultivo carente de pelo de humano. Se aisló y purificó esta proteína por cromatografía, y se obtuvieron Anticuerpos contra ésta en conejos, los cuales fueron capaces de neutralizar completamente la actividad de esta proteína (56). Según Takiuchi (56), Raubitscher (46) estimó que el Peso Molecular de esta queratinasa es de aproximadamente 45000 daltones mientras que Steiner (53) calculó un Peso Molecular de 48000 daltones. Se han observado ligeras diferencias en las propiedades bioquímicas de estas queratinasas; como, según Takiuchi (56), Miyazaki (43) observó dependencia de pH entre queratinasas de M. canis y T. mentagrophytes (55); sin embargo, según Takiuchi (56), Raubitscher (46) observó características inmunológicas idénticas para las enzimas de M. canis, M. gypseum, T. mentagrophytes y T. rubrum. Se realizó la caracterización

parcial de la queratinasa de M. canis; donde se mostró, que esta es capaz de liberar peptidos de proteínas fibrosas de tipo alfa y de la fracción membranosa aislada de el estrato corneo de humano; además la inhibición de la enzima por fenilmetil-sulfonilfluoruro y su débil inhibición por N-etilmaleimida y ácido B-aminostilbenetertetraacético, indicaron que ésta probablemente es una proteinserina (57).

Como consecuencia de la evidente afinidad de los dermatofitos por los tejidos ricos en queratina, es de esperarse que estos hongos posean la capacidad de degradar la queratina y utilizarla como fuente de nutrición. Esto es así, como se demostró anteriormente, pero "in vitro" lo hacen lentamente. Además, las enormes cantidades de queratina que caen continuamente en la tierra son degradadas por otros hongos saprófitos y bacterias, especialmente las especies de Streptomyces, mas que de los dermatofitos aislados de suelo. Por lo anterior parece evidente que la patogenicidad de los dermatofitos depende de otros factores, además de su capacidad para atacar la queratina.

Aunque la mayor parte de los dermatofitos son parásitos epidérmicos en la naturaleza, la queratina no es un factor de crecimiento obligado. Muchas especies crecen perfectamente bien en medios simples con sales amónicas y glucosa como única fuente de hidrógeno, carbono y energía. Sin embargo, el crecimiento es mas exuberante en medios enriquecidos con proteínas y aminoácidos (14).

FACTORES PREDISPONENTES.

Existen gran variedad de factores predisponentes, como en cualquier infección micótica; mencionando a continuación los principales en el caso específico de M. canis:

- Ausencia de ácidos grasos en el cuero cabelludo de prepuberales (Se ha demostrado la actividad antifúngica de los ácidos grasos saturados del sebo).
- Proximidad a animales infectados, tanto a animales que presentan la infección en forma clínica, como a los que la presentan en forma subclínica como es el caso de los gatos; principalmente en niños que son los que generalmente están en mayor contacto con los animales.
- Higiene pobre, tanto de animales como del humano.
- Calor y humedad.
- Nutrición pobre.
- Enfermedades que debilitan al hombre (y a animales).
- Tratamientos con inmunodepresores.
- El estado de la piel.

(14, 60, 63).

CUADRO CLINICO.

En humanos se presentan lesiones en algunas áreas expuestas de la piel o cuero cabelludo; presentando infecciones adquiridas a partir de los animales, que generalmente son de tipo inflamatorio.

Tales lesiones con frecuencia curan espontáneamente en 3 o 4 semanas. No obstante se encuentran infecciones como una pequeña reacción en tejido; siendo crónicas, pudiendo persistir por

varios meses (60).

Las personas con estas tiñas, pueden, además presentar otro tipo de lesión cutánea, que parece ser una reacción alérgica a los antígenos fúngicos que se difunden desde el lugar de la infección, a las cuales se les denomina dermatofitides, presentando la característica de ser estériles y aparecer como vesículas distribuidas en las manos (14).

En humanos cuando la infección se manifiesta en cuero cabelludo, se caracteriza por presentar placas pseudoalopécicas secas, pero cuando la lesión es húmeda además de lo anterior la lesión se torna inflamatoria, ulcerada, reblandecida y exudativa, llamándose Kerion. Por otro lado cuando la tiña es corporis es común que se presenten lesiones anulares eritematopapiloescamosas que varían de 0.5 a 5 cm de diámetro, pudiendo llegar a formar grandes placas. Por último esporádicamente este hongo llega a afectar uña, en donde en su inicio presenta una lesión pequeña del lecho ungueal, extendiéndose posteriormente a la uña. Al principio el área afectada es solamente el borde distal de la uña, el cual se observa amarillento y quebradizo, pero después se extiende a toda la uña, que se deforma y se vuelve opalescente y amarillenta. La porción distal de la uña tiende a separarse del lecho ungueal, apareciendo un tejido entre ambos (60).

Sin embargo se puede llegar a presentar manifestaciones clínicas atípicas, encontrando gran variedad en la sintomatología, como: lesiones tipo Kerion, lesiones parecidas a dermatitis seborreica, lesiones de lesión única de granuloma anular, tumor parecido a un absceso, lesiones en área lampiña,

lesión en palma de manos parecidas a un eritema multiforme, lesiones en el lóbulo auricular parecido a una dermatitis cebrreica, granuloma simple y una infiltración linfocítica simulando a un lupus heritematoso (5).

Las lesiones del gato causadas por M. canis pasan comunmente desapercibidas debido a que con gran frecuencia las esporas de este dermatofito están presentes en el pelo en estado saprófito. Cuando la lesión es visible pueden ser escamosa, vesicular eczematoides, supurativa o simplemente alopésica. Sin embargo en los perros las lesiones son mas evidentes; apareciendo éstas en forma circunscritas y cubiertas con escamas y fragmentos de pelos rofos, otras veces se les ven partes, mas o menos amplias de depilación (2, 3, 26, 47).

Anteriormente se describieron las manifestaciones clinicas típicas; tanto en el humano como en animales, causadas por una infección de M. canis, no habiendo ninguna variación en éstas; en infecciones causadas por M. canis dysgónico (19, 34, 42).

DIAGNOSTICO.

Para llegar a un diagnóstico certero de M. canis y M. canis dysgónico, como para cualquier dermatofito, es necesario seguir un procedimiento adecuado de la muestra, desde su toma hasta la identificación final del hongo causal; para ello la muestra clinica debe someterse al siguiente tratamiento:

1.-EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO.

La muestra se observa utilizando una preparación directa de la muestra con KOH o NaOH al 10-30%, como se describe en materiales y métodos.

En caso de una muestra positiva, esperaríamos observar, las siguientes características: fragmentos de micelio ramificados y artrosporas, en las escamas de piel o uña; y esporas en forma de vaina, rodeando los pelos infectados (microsporosis) en forma ectotrix (sin penetrar el pelo) en el caso de M. canis; mientras que M. canis dysgónico produce microsporosis en los pelos infectados pero no se especifica si es de tipo ectotrix o endotrix (penetrando el pelo) (19, 34, 42).

Lo anterior, en caso de dar positivo, es suficiente para un diagnóstico presuntivo a dermatofitos e iniciar el tratamiento adecuado.

Es necesario continuar con la identificación del agente causal de la infección efectuando:

2.-CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

Como se describe en materiales y métodos.

Otra prueba diagnóstica y epidemiológica, que ayuda para la identificación de M. canis y M. canis dysgónico (8, 17, 18, 19, 28, 34, 42, 60, 63) en una etapa temprana de la infección o cuando se presenta en forma asintomática en perros y gatos principalmente, es la observación de pelos infectados bajo la lámpara de Wood, donde se presenta una fluorescencia amarillo verdosa.

TRATAMIENTO.

En general para M. canis y M. canis dysgónico como para cualquier dermatofito; se utilizan los siguientes tratamientos según lo requerido en cada caso:

A)TOPICO: Se hace a base de fungistáticos y queratinolíticos

o de la asociación de ambos

Entre los fungistáticos mas utilizados están:

-Tintura de yodo, ácido benzóico y undecilénico, tonalftato (tinaderm)

-Con frecuencia se emplean asociaciones de fungistáticos y queratinolíticos, tales como el preparado de Whitfield

-Como se dijo anteriormente la resistencia de los adultos a la infección del cuero cabelludo se ha relacionado con el aumento de la actividad secretoria de las glándulas sebaceas en la pubertad y la actividad antifúngica demostrada de los ácidos grasos saturados del sebo; por ello, se ha utilizado con éxito el ácido undecilénico, un ácido graso no saturado C11, para el tratamiento tópico de algunas dermatomicosis (14).

B) SISTEMICO: Mediante la ingestión de Griseofulvina (Fulcín Frote), que actua como antidermatofílico y promueve el crecimiento del epitelio. Obtenido de Penicillium griseofulvum en 1953. Su mecanismo de acción se basa en la ruptura del huso mitótico y posiblemente de algunos organelos tubulares citoplásmaticos, impidiendo la división nuclear y la acumulación de DNA. También afecta la pared celular. Se administra en las siguientes dosis según los requerimientos.

-Tiña capitis.- De 1 a 1.5 gr diarios (15 a 25 mg por kilo de peso) durante 45 a 60 días.

-Tiña corporis.- De 0.5 a 1 gr diarios, durante un mes.

-Tiña únguis.- De 1.5 a 2 gr diarios de 4 a 5 meses, en pies mas de 18 meses (23, 36, 49, 59, 60, 63).

En 1981 se encontró que el citrato de cafeína, clorhidrato de quinina y sulfato de quinina entre otras sales alcaloides son sumamente efectivas como fungicidas. Terapéuticamente se aplica de 5% de solución y unguento de citrato de cafeína, hidrocloreto de quinina y sulfato de quinina fueron mas potentes que unguentos de clotrimazol en curaciones de infecciones experimentales en cuyes (60, 63).

Según Meingassner (40), Georgopoulos (24) y Petranyi (45) encuentran que la naftafina (E-N-Metil-N-(1-naftilmetil)-3-fenil-2-propen-1-amino-hidrocloreto) es un antifúngico que ha mostrado una alta actividad contra las especies de Trichophyton, Epidermophyton y Microsporum tanto en experimentos "in vitro" como "in vivo" y una anderada actividad contra Aspergillusspp; Sporothrix schenckii y Candida spp (40). La mayoría de las alteraciones ultraestructurales significativas causadas en T. mentagrophytes tratadas con naftafina "in vitro", fue la acumulación de estructuras esféricas y ovals de naturaleza lipídica en la superficie celular, en toda la capa de la pared celular en ambos lados de la membrana celular que se observa alterada. Las inclusiones lipídicas también fueron encontradas en grandes vacuolas intercelulares, sugiriendo que la naftafina interactúa con el metabolismo de lípidos del hongo. Esta droga ha mostrado una inhibición en la biosíntesis de ergosterol causando la acumulación de escualeno (39). En Candida parapsilopsis también se ha observado cambios ultraestructurales dependientes de dosis, de esta droga; mostrando un incremento en la acumulación de partículas lipídicas en el citoplasma,

engrasamiento de la pared celular y alteraciones de la membrana plasmática por estructuras vesiculares; estos cambios causan una destrucción progresiva de la arquitectura celular; que junto con estudios bioquímicos sugiere la interacción de la naftafina con la biosíntesis de esterol (40).

El análisis de las características morfológicas de M. canis y M. canis dysgónico se ha hecho utilizando microscopía óptica, sin embargo las limitantes de aumento y resolución del mismo, no permiten un análisis morfológico detallado para distinguir diferencias y similitudes entre estas 2 cepas; características útiles para una correcta clasificación de M. canis dysgónico. Por esta razón en el presente trabajo se utilizó el M.E.B. cuya mayor capacidad de aumento y resolución permite observaciones morfológicas imposibles de ver por microscopía óptica. Además, el análisis de las estructuras internas de cada cepa permite tanto la comparación morfológica interna de ambos, como el poder detectar partículas extrañas no presentes comúnmente en estos hongos; para lo cual se utilizó el M.E.T..

Por lo anterior se hace una breve descripción y comparación de los tres tipos de microscopía como un apoyo teórico para la comprensión de las características y ventajas que ofrece cada uno de éstos.

COMPARACION DEL MICROSCOPIO DE LUZ, MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO Y DEL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION.

-AUMENTO.

El aumento efectivo máximo del microscopio óptico (MO) es de aproximadamente 1.200 diámetros, mientras que el del mejor

microscopio electrónico de transmisión (MET) se acerca a 1.000.000. El microscopio electrónico de barrido (MEB) puede lograr un aumento entre 15 y 50.000 diámetros aproximadamente, dependiendo de la naturaleza y forma del material examinado. El valor de la ampliación de la gama de aumento de MEB desde aproximadamente 2X hasta 50X ha sido puesto de manifiesto por Meakin y Fallon en 1973. Dentro de esta gama pueden obtenerse buenas fotografías aumentando las distancias de maniobra.

-RESOLUCION.

La resolución máxima (o distancia mínima a la que pueden estar separados dos objetos y ser diferenciados) del MO es de aproximadamente 2.000 a 3.000 amstrons (200 a 300 nm). Los mejores MET tienen un poder resolutivo de 2 a 5 amstrons (0.2 a 0.5nm). La mayor parte de los MEB tienen una resolución de 100 a 200 amstrons (10 a 20 nm) dependiendo de la naturaleza y condiciones de la muestra, así como de la tensión de trabajo del instrumento y del tamaño final de abertura. La resolución es de 100 amstrons a 30 KV.

-PROFUNDIDAD DE CAMPO.

La principal característica de las micrografías obtenidas con el MEB es su notable calidad tridimensional. Por el contrario, las típicas micrografías obtenidas con el MO o el MET son imágenes bidimensionales. El MO solo puede ser enfocado en un plano único; por tanto, su profundidad de campo es muy limitada. Para revelar la forma de los objetos solamente es útil en pequeños aumentos ya que, al aumentar estos, la profundidad de campo disminuye. Para los detalles internos, el MO se utiliza con

muestras planas y delgadas requiriéndose para el MET cortes aun mas finos; para el estudio con el MO suelen ser del orden de los 8 a 15 μ m, mientras que los del MET generalmente tienen grosores que van de 300 a 700 amstrons y han de hacerse en microtomos especiales. Al ser tan delgados los especimenes examinados en el MET, la profundidad de campo es limitada, obteniendose una imagen esencialmente bidimensional. Tales limites no existen con el MEB. A diferencia del MO o el MEI, en los que la fuente de iluminaci3n (luz o electrones) debe pasar a trav3s del objeto, con el MED los electrones que se registran no lo atraviesan, si no que son electrones secundarios captados de su superficie y utilizados para formar una imagen. Estos electrones secundarios no precisan ser enfocados, si no solamente recogidos. Por tanto, con el MEB no existen otros limites de tama1o de la muestra estudiada que la capacidad de la platina.

En orden al aumento y a la resoluci3n, el MEB suele tener valores intermedios entre los del MO y el MET. Las propiedades que verdaderamente caracterizan al MEB son el gran tama1o de la muestra que pueden observarse y la gran profundidad de campo. Esta 3ltima, comparada con la del MO y a igualdad de aumento, es al menos 300 veces mayor (32).

El aislamiento de M. canis dysonici y el aumento en la incidencia de este hongo, han atraido la atenci3n de varios investigadores; ya que este dermatofito no presenta caracteristicas que permitan clasificarlo dentro de las especies conocidas y comunmente aisladas; sin embargo, ya que presenta una morfologia parecida a M. canis; se le ha llamado como M. canis

dysónico, sin poderlo clasificar aun como una variante de M. canis o como una especie diferente de dermatofito; por estas razones se planteó el siguiente objetivo de trabajo.

IV.OBJETIVO.

Realizar un estudio sobre una cepa de Microsporium canis dysgonica para intentar su correcta clasificación dentro del genero Microsporium, como una posible variante de Microsporium canis.

V. MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES.

MATERIAL BIOLÓGICO.

CEPAS UBADAS.

Microsporum canis.

Se utilizaron 3 cepas de M. canis, aisladas; en el primer caso de una muestra de piel y pelo de una tiña en perro; en el segundo de una muestra de piel de una tiña corporis en humano; perteneciente a una paciente de sexo femenino de 22 años de edad (caso no. 43) y finalmente una cepa de M. canis dyabólico, aislada a partir de una muestra de piel y pelo de un cachorro, raza boxer, macho, de 5 meses de edad proveniente de la ciudad de Dunfries, Escocia, que presentaba lesiones con características que correspondían a dermatomicosis en la región periorcular y cuello.

SOLUCIONES Y REACTIVOS.

Solución aclarante (lactofenol).

20 gr	fenol
20 ml	Acido láctico
40 ml	glicerina
20 ml	agua destilada estéril

Disolver en el agua destilada estéril el fenol, en baño María, agregar el Acido láctico y la glicerina. A los 80 ml resultantes del aclarante se agregan 0.05 gr de azul de algodón, mezclar y filtrar.

Tampon fosfatos 0,1M pH7,4.

a. Fosfato sódico dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 11.87 gr

- b. Fosfato potásico, monobásico (KH_2PO_4) 9.08 gr
Agua destilada 1000 ml
Se agregó 81.8 ml de la solución a y 18.2 ml de la solución b.

MEDIOS DE CULTIVO.

Medio de cultivo SDA para mantenimiento de las cepas.

Se preparó en tubos pyrex de 150 x 20 mm conteniendo cada uno 6 ml de medio SDA esterilizados en autoclave a 15 lb/121 °C/15 minutos y gelificados en posición inclinada.

Medio de arroz para mantenimiento de las cepas.

Preparado en viales de vidrio de 10 a 20 ml en que se colocaron aproximadamente 1/3 del volumen del vial de granos de arroz y 2 o 3 ml de agua, se esterilizaron a 15 lb/121 °C/15 minutos.

Medios de cultivo pobres.

Estos medios de cultivo fueron preparados en tubos de vidrio pyrex de 100 x 13 mm con tapón de rosca, conteniendo 2.5 ml de medio cada uno. Los medios contenían:

Dextrosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Lactosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{H}_2$
Sacarosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$
Galactosa	$\text{CH}_2\text{OH CH (COH)}_3 \text{CHOH}$
D(+)-Xylosa	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$
D(+)-Manosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
D(-)-Fructuosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Rafinosa	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
L(+)-Arabinosa	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5$

Maltosa	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$
L-Alanina	$C_3H_7NO_2$
L-Cysteina	$C_3H_7NO_2S$
L(+)-Acido ascórbico (Vitamina C)	$C_6H_8O_6$
Tiamina	$C_{12}H_{17}N_4OSCl \cdot HCl$

y agregar al 20% final, disueltos en agua bidestilada estéril. Cada una de las sustancias se prepararon a 3 distintas concentraciones: de 2.5, 5, y 10 % final, efectuando el experimento por duplicado. Las sustancias utilizadas se prepararon en stock mas concentrados y se esterilizaron por filtración en filtros millipore con membranas de 0.45µm de poro (por ser este el método de elección en estos casos, para evitar la descomposición de estas sustancias por autoclaveado) (37). El agar se esterilizó en autoclave a 15 lb/121°C/15 minutos, se dejó enfriar y se mantuvo en baño María a aproximadamente 45°C y entonces se mezcló con cada una de las sustancias en cantidad suficiente para obtener la concentración final deseada. Se dejó gelificar en posición inclinada.

Medio de cultivo rico.

En tubos de vidrio pyrex de 150X20 mm conteniendo c/u 6 mililitros de medio preparado con harina de arroz a concentraciones de 2, 4, 8 y 12% mas polipeptona al 1, 2.5, y 5% en cada una de las concentraciones de harina de arroz antes citadas, y agar a una concentración final del 2%. Los tubos conteniendo el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 15 lb/12°C/10 minutos y se dejaron gelificar en posición inclinada.

EQUIPO.

Aparato de secado a punto crítico.

Marca Technica, Springfield, Virginia, modelo CPA II.

Metalizador.

Fine coat, Ion sputter JFC-1100 Jeol LTD.

Microscopio electrónico de barrido.

Jeol JSM-25 II.

Microcentrífuga.

Eppendorf marca Brinkmann (5412).

Ultramicrotomo.

Marca Bromma LKB 8800 (Ultramicrotome III) y otro marca Reichert-Jung (Ultracut tipo 701704)

MATERIAL FOTOGRAFICO.

Microscopio electrónico de barrido. Se uso películas Kodak Royal Panromática 4141 10.2x12.7 cm de 4x5 pg, no. de catálogo 6003107. Papel de impresión Kodak photographic paper, polycontrast rapid II RC, cat. 1926450.

Microscopio electrónico de transmisión. Película de 35 mm Kodak PLUS-X-PAN Graphic Arts Film Orthochromatic 8.3x10.2 cm. DuPont 31/4x4 in.

MÉTODOS.

PROCEBAMIENTO DE LA MUESTRA CLINICA (para diagnóstico y aislamiento de las cepas).

La muestra clínica se dividió en tres partes; dándole a cada una de ellas uno de los siguientes tratamientos:

A. EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO (técnica del KOH al 10% o 20%).

Frente al mechero y sobre un portaobjetos, se depositaron una pequeña cantidad de pelos y escamas raspadas de la periferia de la lesión. Se agregaron de 2 a 3 gotas de una solución de KOH al 10 o 20%. Se dejó en reposo la preparación durante 10 o 15 minutos o se le dio un ligero calentamiento a la laminilla con la flama del mechero para acelerar el aclaramiento de la muestra. Se colocó un cubreobjetos cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Se presionó ligeramente el cubreobjetos para extender la muestra y eliminar las burbujas que habían quedado. Se observó al microscopio de luz con el objetivo seco débil (10X) y seco fuerte (40X) para la identificación de las estructuras buscadas.

B. CULTIVO EN MEDIOS SELECTIVOS (técnica de picadura).

Pequeños fragmentos de escamas y pelos de la muestra clínica fueron sembrados por la técnica de picadura y en condiciones de esterilidad en cajas de cultivo conteniendo agar micoseal (BRL) o agar micobiotic (Bioxon). Esta técnica consistió en introducir entre el agar en diversas partes de la placa un fragmento de las escamas o pelos completos (arrancados desde la raíz) de la muestra clínica, con ayuda de una asa de platino en forma de L. Las cajas se incubaron a 37°C/24 horas y posteriormente se dejaron a temperatura ambiente hasta el desarrollo total de las colonias, el cual se obtuvo alrededor de dos semanas después.

C. ALMACENAMIENTO.

La última fracción de la muestra clínica se colocó entre dos portaobjetos mantenidos unidos con cinta adhesiva y éstos dentro de un sobre de papel, etiquetado con los datos necesarios para su identificación. Los sobres se guardaron en un lugar seco hasta su

uso en caso necesario.

ANALISIS MACROSCOPICO DE LAS CEPAS.

El análisis macroscópico de las colonias tanto durante su desarrollo como en su fase madura y vejez, se efectuó a simple vista, usando los siguientes criterios de evaluación:

- Aspecto de la colonia (color, forma, etc.).
- Morfología general (plana, agrupada, con pliegues regulares o irregulares, etc.).
- Textura (aterciopelada, cerosa, vellosa, pulverulenta, granular, etc.).
- Tiempo de crecimiento o desarrollo.
- Pigmentación y difusión del pigmento Al reverso de la colonia.

ANALISIS MICROSCOPICO DE LAS CEPAS.

A. TINCION CON AZUL DE ALGODON LACTOFENOL.

Se colocó un portaobjetos sobre una hoja blanca (de ser posible debe hacerse en una superficie transparente e iluminada). En el centro del portaobjetos se agregó una gota de azul de algodón lactofenol (Solución aclarante lactofenol). Se removió un fragmento de la colonia del hongo (aproximadamente de la 2 mm dentro de la periferia) con una asa de platino en forma de L, y se depositó sobre la gota del colorante. Se desbarató cuidadosamente el fragmento de la colonia utilizando el asa de inoculación y/o una aguja de disección. Se colocó con cuidado un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas y no presionar el cubreobjetos ya que esto podría desprender algunas estructuras del hongo. Las preparaciones que se requirió guardar

por largos periodos se les quitó el exceso de colorante, adsorbiendo éste de los extremos del cubreobjetos con papel, algodón o gasa y sellando el contorno de éste con esmalte de uñas (de preferencia incoloro). Las preparaciones se revisaron al microscopio con el objetivo seco debil (10X) y seco fuerte (40X) para analizar las características microscópicas del hongo, usando para ello los siguientes criterios de evaluación:

- Forma, distribución y ornamentación de la hifa.
- Presencia o ausencia de clamidiosporas y microconidias; así como de su número, forma y distribución.
- Características de las macroconidias (número y forma de las macroconidias; y número, forma y distribución de septos y ornamentación de las mismas).

B. TECNICA DE MICROCULTIVO.

Para estos cultivos el crecimiento se realiza en una cámara húmeda, preparada en una caja de petri: a la que se colocó dentro, una varilla de vidrio doblada y un portaobjetos y cubreobjetos sobre ésta. Este paquete se envolvió en papel de estraza, se esterilizó en autoclave a 121 °C /15 lb/15 minutos, y se almacenó hasta su uso. Paralelamente se prepararon cajas de petri conteniendo aproximadamente de 30 a 35 ml de medio SDA (Bioxon). Bajo condiciones de esterilidad, se cortó un bloque de aproximadamente 1 cm³ con bisturí. Se inocularon picando en el centro de los cuatro lados del bloque de agar con el asa de platino en forma de L, las esporas o el crecimiento micelial del hongo. Se colocó un cubreobjetos utilizando unas pinzas previamente flameadas, encima del bloque, haciendo después una

ligera presión. Se agregaron aproximadamente 10 ml de agua destilada estéril teniendo cuidado de que el nivel del líquido no toque el portaobjetos. Se incubó el microcultivo a 37°C/24 horas y a temperatura ambiente durante 2 a 3 semanas hasta observar el desarrollo completo del micelio aéreo a todo el contorno del bloque de agar corroborando la presencia de estas estructuras con la observación de la colonia en un microscopio estereoscópico; momento en que la preparación estuvo lista para su observación microscópica, ya que, el micelio aéreo creció por la superficie tanto del portaobjetos como del cubreobjetos. Antes de observar, se retira el agua destilada con una pipeta; y con ayuda de un bisturí y pinzas previamente flameadas y teniendo el cuidado necesario para no dañar las estructuras del hongo, se retiró el cubreobjetos, después el agar y después el portaobjetos del microcultivo. Para el examen microscópico, se agregaron 1 o 2 gotas del colorante azul de algodón-lactofenol en un portaobjetos limpio y se colocó el cubreobjetos del microcultivo sobre el colorante; por otro lado, el portaobjetos del microcultivo se le agregó el colorante en el centro del crecimiento del hongo y se colocó sobre de éste un cubreobjetos limpio. Se tuvo el cuidado suficiente procurando evitar la formación de burbujas y de no presionar el cubreobjetos ya que esto podría desprender algunas estructuras del hongo. A las preparaciones que se requirió guardar se sellaron con esmalte como se describió anteriormente. Las preparaciones se revisaron al microscopio de luz con el objetivo seco débil (10X) y seco fuerte (40X) para analizar las características microscópicas del hongo; usando para ello los

critérios de evaluación mencionados en el inciso anterior (tinción con azul de algodón-lactofenol). Con este procedimiento se obtuvieron dos preparaciones con el micelio, esporas y conexiones intactas para una mejor apreciación y análisis de las estructuras.

MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.

(medio de cultivo SDA y medio de arroz).

Cada una de las cepas aisladas y purificadas en el medio selectivo (descrito anteriormente), fue resembrada pura, para su mantenimiento; por la técnica de picadura (descrita anteriormente) sembrando un inóculo en el centro del agar. Los tubos y viales inoculados se incubaron a 37°C/24 horas y posteriormente a temperatura ambiente hasta obtener el desarrollo del micelio aéreo (aproximadamente de 2 a 2.5 semanas) y entonces según lo requiriera el experimento, o se guardaban a 4°C permaneciendo a esta temperatura hasta que el cultivo requiriera resiembra (entre 2 o 3 meses), repitiendo nuevamente el mismo protocolo; o se resembraron periódicamente en un lapso de 15 a 30 días de edad del cultivo, manteniéndose el primer día a 37°C/24 horas y posteriormente a temperatura ambiente. En cada una de las resiembras se revisaban y registraron cuidadosamente las características micro y macroscópicas (descritas anteriormente) del hongo.

CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO POBRES.

En cada una de las sustancias y por duplicado se sembró tanto M. canis como M. canis dysgónico a partir de la primer resiembra en SDA, colocando un solo inóculo por la técnica de

picadura (descrita anteriormente) en el centro del agar, los tubos se incubaron a 37°C/24 horas y se dejaron posteriormente a temperatura ambiente, revisando diariamente su desarrollo y registrando así sus características macroscópicas de las colonias durante todo su crecimiento. Una vez que las cepas alcanzaron su estado de madurez máximo, a los 39 días se hicieron tinciones con azul de algodón lactofenol (descritas anteriormente) para efectuar el análisis microscópico de cada una de las cepas.

CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO RICOS.

Tanto la cepa de M. canis como de M. canis dysgonic se sembraron en medios de cultivo ricos, para producción de macroconidias.

Ambas cepas se sembraron por duplicado colocando un solo inóculo por la técnica de picadura (descrita anteriormente) en el centro del agar; los tubos se incubaron a 37°C/24 horas y se dejaron a temperatura ambiente, revisando diariamente su desarrollo y registrando así sus características macroscópicas (antes mencionadas) de las colonias durante todo su crecimiento. Una vez que las cepas alcanzaron su estado de madurez (a los 10 días) se hicieron tinciones con azul de algodón-lactofenol (descritas anteriormente) para efectuar el análisis microscópico de cada una de las cepas.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Tanto la cepa control (M. canis) como la cepa variante (M. canis dysgonicus) se cultivaron por la tecnica de microcultivo, descrita anteriormente, usando medio de SDA y medio de harina de arroz mas dextrosa al 2%. Se incubaron a 37°C/24 horas y a temperatura ambiente durante 15 y 30 días; al término de este tiempo y dentro de la misma caja, las muestras se sometieron al siguiente tratamiento.

-Con ayuda de una pipeta, se quito el agua que contenia la caja de microcultivo.

-FIJACION. Las muestras fueron fijadas con vapores de glutaraldehido al 6% en tampon fosfatos 0.1M pH7.4 colocado en el fondo de la caja de 1 a 2 ml durante 4 horas a 4°C. Al término de este tiempo el glutaraldehido fue eliminado y la caja se enjuagó con el mismo tampon de fosfatos.

-POBFIJACION. Las muestras fueron posfijadas en tetróxido de osmio al 1% en tampon fosfatos 0.1M pH 7.4, durante 2 horas a 4°C.

-LAVADO Y TALLADO. Con ayuda de pinzas y bisturi, se quitó cuidadosamente el cubreobjetos, el bloque de agar y el portaobjetos procurando no tocar las estructuras del hongo, y se colocaron en una caja de petri limpia y esteril. El material se lavó durante 2 horas a 4°C con tampon fosfatos 0.1M pH7.4, al que se le agregó 6.8% de sacarosa para mantener la osmolaridad. El vidrio del portaobjetos y cubreobjetos se rompió cuidadosamente en fragmentos pequeños de aproximadamente

4-8 mm y el bloque de agar se talló en piezas de 4X0X2 mm.

-DESHIDRATACION. Las muestras se deshidrataron en acetona de porcentaje progresivos: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y acetona absoluta. En cada acetona se dejaron aproximadamente 30 minutos, excepto en la de 70% que fue de 12 a 24 horas. La acetona absoluta se renovó 3 veces. Finalmente se dejaron en acetato de amilo por 30 minutos.

-SECADO POR EL PROCEDIMIENTO DE PUNTO CRITICO. Las muestras fueron introducidas en la cámara de presión del aparato de secado a punto crítico, sumergidas en acetato de amilo. En la cámara se verifica el cambio de acetato de amilo por dióxido de carbono líquido. Eliminado el acetato de amilo se calienta lentamente la cámara por medio de agua hasta que el dióxido de carbono pasa, en su punto crítico (31.5°C), de líquido a gas, preservando así las superficies de las muestras de las tensiones que sufrirían con otro método de secado, por ejemplo, el aire.

-METALIZACION. Después de haber fijado las muestras con plata coloidal a los porta-muestras, se colocaron estas en la cámara del metalizador para revestirlas de oro. Los tiempos de descarga fueron de 3 minutos manteniendo el amperage a 20 miliamperios.

-OBSERVACION. Las piezas fueron estudiadas y fotografiadas con el microscopio electrónico de barrido.

El voltaje de aceleración varió entre 5 y 12.5 Kilovoltios (KV), como también el tamaño del haz incidente en la muestra que fue de 2.500, 1.2500, 640 o 320 amstron, dependiendo de los

aumentos que se querian obtener. Los diafragmas de 400,200 y 100 μ también fueron usados alternativamente. El tiempo de barrido por cuadro fue de 32 milisegundos.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

A.TINCION NEGATIVA.

Las cepas de M. canis y M. canis dyegónico se crecieron en 50 ml de medio de cultivo SDA en un matraz de 125 ml; se incubaron a 37°C/24 horas y a temperatura ambiente de 15 a 30 días. En un fragmento de parafilm se colocó una gota de cada uno de los medios de cultivo anteriores y sobre de esta una rejilla a la que previamente se le cubrió una de sus caras con una película de formvar colocando esta con la cara cubierta con la película en contacto con la gota de medio de cultivo, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se quitó cuidadosamente la rejilla con unas pinzas y se colocó con la cara cubierta con la película de formvar hacia arriba sobre un papel de filtro y dentro de una caja de petri tapada se dejó secar a 47°C/15 minutos. Una vez seca se colocó sobre una gota de Acido fosfotúngstico al 2% con la cara cubierta con la película en contacto con el colorante y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró y colocó nuevamente sobre un papel filtro dejando secarse a 47°C/15 minutos igual como se cito anteriormente. El material fue estudiado y fotografiado con el microscopio electrónico de transmisión. El tiempo de exposición fue de 0 a 60 segundos y el diafragma de contraste usado, de 100 a 400 μ .

B. INCLUSION, OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS Y ULTRAFINOS Y TINCION DE REYNOLDS.

De cultivos en medio de SDA y medio de arroz de 15 y 30 días de edad, así como de diferente número de resiembas de las cepas de M. canis y M. canis dysgónico, se tomó una fracción del micelio aéreo y vegetativo del hongo, y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml limpios y estériles.

-FIJACION. Se agregó aproximadamente 1 ml de solución de tetróxido de osmio al 1% en tampon fosfatos 0.1M pH7.4 y se dejó a 4°C por 2 horas y 18 horas para la fijación de las muestras.

-LAVADO Y TALLADO. Se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 15 minutos en una microcentrifuga eppendorf y se decantó la solución fijadora. Se agregó un volumen igual de tampon fosfatos 0.1M pH 7.4 y se lavo durante 30 minutos, se centrifugó nuevamente a 15000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó una vez mas de la misma manera. En forma paralela se preparó una solución que contenía tampon fosfatos 0.1M pH 7.4 mas agar base a una concentración final de 2.5%, se esterilizó en autoclave a 15lb/121°C/25 minutos y se mantuvo en baño María a 45°C. La pastilla del micelio del hongo obtenida anteriormente se resuspendió cuidadosamente en 500 ml de la solución de agar en tampon fosfatos y se dejó gelificar dentro de la punta del tubo eppendorf. Ya gelificadas, las muestras fueron sacadas de los tubos eppendorf y talladas en bloques de aproximadamente 1 mm³.

-DESHIDRATACION. Las muestras siguieron un proceso gradual de

deshidratación con acetona 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y acetona absoluta. En cada acetona permanecieron 30 minutos. A la acetona de 70% se agregó 2% de acetato de uranilo para el contraste en bloque, y se dejaron toda la noche en ella. La acetona absoluta se renovó tres veces. Finalmente, se le dieron dos pases de 5 minutos en óxido de propileno.

-INCLUSION. Las piezas fueron pasando gradualmente por mezclas de óxido de propileno-araldita hasta araldita pura, siguiendo las técnicas habituales.

-OBTENCION DE CORTES SEMIFINOS, ULTRAFINOS Y CONTRASTE. Se obtuvieron cortes semifinos (1 a 2 μ) con un ultramicrotomo, se tificaron con azul de toluidina y posteriormente, se obtuvieron cortes ultrafinos (400 y 600 Å) que fueron contrastados según el método de Reynolds (41, 48).

-OBSERVACION. Los cortes semifinos fueron observados en un microscopio de luz. El material de los cortes ultrafinos fue estudiado y fotografiado con el microscopio electrónico de transmisión. El tiempo de exposición fue de 1 a 60 segundos y el diafragma de contraste usado, de 100 a 400 μ .

AISLAMIENTO DE PARTICULAS VIRALES DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA DE *M. canis dysgonico* Y SU TRANSFERENCIA A CULTIVOS DE *M. canis* EN MEDIO EN DEBARRILLO EN MEDIO SDL.

Las cepas de *M. canis* y *M. canis dysgonic* se crecieron en 100 ml de medio de cultivo SDL en un matraz de 250 ml; se incubaron a 37°C/24 horas y a temperatura ambiente por 30 días. Bajo condiciones de esterilidad el sobrenadante de estos cultivos se transfirieron por separado a un matraz limpio y estéril.

procurando en lo posible no arrastrar el micelio y macroconidias del hongo. Una pequeña alícuota (1 a 2 gotas) de estos sobrenadantes se procesó por la técnica de tinción negativa descrita con detalle anteriormente, para su observación a través de microscopía electrónica de transmisión.

Posteriormente, el sobrenadante de M. canis dysgónico se prefiltró en filtros millipore a través de membranas de 0.45 μm de poro, y se filtró en membranas de 0.22 μm de poro. Se transfirió una alícuota de 30 ml a un matraz de 250 ml conteniendo 100 ml de medio SDL fresco y estéril, y se inoculó con micelio y macroconidias de M. canis. En 130 ml de medio SDL fresco se inocularon las cepas control de M. canis y M. canis dysgónico por separado y se incubaron a 37°C/24 horas y a temperatura ambiente por 30 días; describiendo detalladamente el desarrollo y comportamiento de las cepas durante su crecimiento. Al término de su desarrollo (15 días) se analizaron con detalle sus características macro y microscópicas de cada cepa de acuerdo con la metodología y criterios descritos al inicio de este capítulo.

VI. RESULTADOS.

DESCRIPCION MORFOLOGICA DE M. canis Y M. canis dysgonicus EN SU PRIMOISLAMIENTO Y A TRAVES DE VARIAS RESIEMBRAS, UTILIZANDO MICROSCOPIA DE LUZ.

La cepa de M. canis y M. canis dysgonicus fueron aisladas en su primoaislamiento en medio micobiotic, a partir de la muestra clinica; posteriormente fueron resebradas en medio SDA y medio de granos de arroz para su mantenimiento. En el primoaislamiento y en cada resiembra, así como durante todo su desarrollo se observó y describió cuidadosamente tanto sus características macro y microscópicas de cada una de las cepas, con la finalidad de saber con precisión cuales son las características que las distinguen y cuales tienen en común; utilizando para ello los criterios de evaluación así como las metodologías de tinción con azul de algodón lactofenol y técnica de microcultivo para la observación de la muestra en microscopía de luz; descritas en materiales y métodos.

La cepa de M. canis, en su primoaislamiento en medio micobiotic como en sus resiembras en medio SDA mostró las mismas características macro y microscópicas. En medio de arroz el desarrollo básicamente es igual en sus características y cambios durante su envejecimiento, a los descritos en medio SDA, pero la cantidad de macroconidias producidas es mayor y la población es mas homogénea en su grado de evolución en un momento dado, comparada con el medio SDA donde se observó una población un poco heterogénea presentando macroconidias en diferentes etapas de desarrollo. Estas características se describen en el cuadro no. 1

donde se reportan las características macro y microscópicas de M. canis en medio SDA y de arroz; y en la figura no. 1 donde se pueden observar las características microscópicas de la hifas y macroconidias de M. canis a los 15 días de desarrollo en una tinción con azul de algodón lactofenol utilizando microscopía óptica

La cepa de M. canis dysgónico en medio SDA, no se comportó de la misma manera en su primoaislamiento y durante sus resiembras, como puede verse, en el cuadro no. 2; donde se reportan las características macro y microscópicas durante su etapa de madures (15 a 30 días) en su primoaislamiento y en diversas resiembras en medio SDA. La inestabilidad en cultivo de M. canis dysgónico mostró diferencias morfológicas que hacen necesario diferenciar estas etapas; en el primer caso como M. canis dysgónico, que se caracterizó por producir únicamente micelio vegetativo tipo disgonico y cepa atípica de M. canis que se distingue por presentar hifas y macroconidias con una amplia gama de alteraciones morfológicas, además de otras con una apariencia normal parecidas a las de M. canis. Se observó que las características, mas sobresalientes son : a) Macroscópicamente, la diferente morfología colonial al paso de la resiembras y b) Microscópicamente, el tipo de micelio obtenido así como la producción y características de las macroconidias; mismas que pueden verse en la figura no. 2 y no. 3a y 3b donde se reportan las observaciones hechas por microscopía óptica de las hifas de M. canis dysgónico; y del micelio y macroconidias de la cepa atípica de M. canis respectivamente. En medio de arroz las

características macroscópicas de M. canis dysgónico no variaron durante sus resiembras. Se obtuvo una colonia café claro con apariencia vellosa (como telaraña) y pequeños puntos color crema, sobre toda la superficie de arroz; una producción de pigmento amarillo oscuro que difunde a los granos de arroz, de la periferia tornandolos a un color café claro, que es muy similar a la apariencia macroscópica de la cepa normal de M. canis en este medio. Microscópicamente desde su primer resiembra hasta la 6a. se obtuvieron hifas con características aparentemente normales y macroconidias que en su mayoría (mas del 90%) presentaban una apariencia normal y solo aproximadamente menor o igual a un 10 % eran de tipo dysgónico hasta que en la 6a. resiembra en este medio la cepa mostró la forma típica de M. canis. Durante su crecimiento, en términos generales se observó que el desarrollo del hongo desde su inicio hasta su madurez y su muerte básicamente sigue la misma secuencia que la cepa normal de M. canis; con la única diferencia de que M. canis dysgónico presenta un crecimiento mas lento y la cepa se muestra un poco mas lábil al efecto del tiempo.

CUADRO No. 1

CARACTERISTICAS MACRO Y MICROSCOPICAS DE *M. SARIA*
EN MEDIO SDA Y DE ARROZ

CARACTERISTICAS							
MACROSCOPICAS			MICROSCOPICAS				
ASPECTO COLONIAL	TEXTURA	PIGMENTO AL REVERSO	HIFAS	MICROCONIDIOS	MACROCONIDIOS		
MORFOLOGIA					FORMA	SEPTOS	ORNAMENTACION
Plano blan- co - es verde crema pardo de	Azulado en amarillo pardo de	Amari- llo naran- ja in- tenso	Forma bu- bulosa - dulgada. Pocas en forma de raqueta, me- pectina- das son redonde- adas y ciliadas - disper-	Esfericas en fer- ma de clava o pirifer- as	Navic- ular elip- soidal	7-10	Espi- culas de

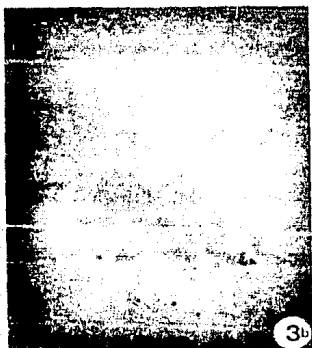
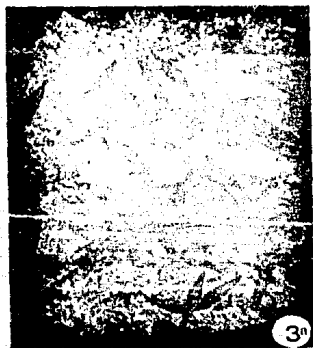
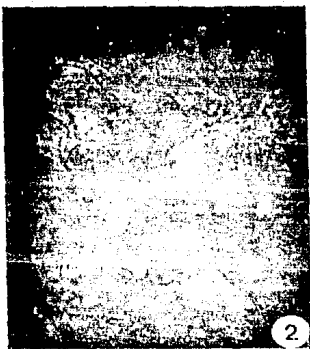
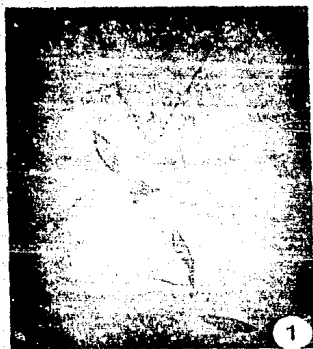
PAS

• Estas especies cuando envejecen desarrollan en algunas zonas
relativas al tipo de habitat principalmente cuando se
está el nivel.

M. Naranjo

D. Divergencia

- No presentes
- Poco comunes
- Regular comunes
- Abundante comunes
- Muy abundante comunes
- Muy comunes



PIEB DE FIGURA.

Figura no. 1.-Hifas y Macroconidias de M. canis/m.o.
Cultivo de 15 días de desarrollo. Se observan hifas tubulares delgadas, septadas homogéneamente. Macroconidias en forma navicular alargada, con sus extremos en punta. (tinción con azul de algodón lactofenol/M.O.). Aumento 25X.

Figura no. 2.-Hifas de M. canis dysgónico / M.O.
Las hifas se observan mas gruesas que las vistas en la cepa normal, además de formar una amplia gama de alteraciones, como ensanchamientos, protuberancias y ramificaciones en diferentes sentidos, entre otras. Se observan algunas con características aparentemente normales. (tinción con azul de algodón lactofenol/M.O.). Aumento 40X.

Figura no. 3a.-Micelio y macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.O
Se observan macroconidias dysgónicas con su extremo distal bifurcado, y macroconidias con diferentes formas. El número de septos es de 1 a 6.

Figura no. 3b.-Micelio y Macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.O
Se observa una mezcla de micelio dysgónico con aparentemente normal, y macroconidias de diferentes tamaños, observando algunas en forma de "S". El número de septos es de 1 a 8. (tinción con azul de algodón lactofenol/M.O.). Aumento 25X.

**COMPORTAMIENTO DE LA CEPA DE M. canis Y M. canis dysgénica
EN DISTINTAS CONDICIONES NUTRICIONALES.**

La cepa de M. canis y M. canis dysgénica fueron sembradas por duplicado (a partir de la 1er. resiembra en medio SDA después de su primoaislamiento) en dos tipos de medios: a) En medios pobres constituidos por agar al 2% más un azúcar, un aminoácido o una vitamina a tres distintas concentraciones del 2.5%, 5%, o 10% y b) En medios ricos, preparados con harina de arroz al 2%, 4%, 8%, o 12% más polipeptona al 1%, 2.5% o 5% para cada concentración de harina de arroz, más 2% de agar; y harina de arroz al 8% más 2%, 4% u 8% de dextrosa más 2% de agar; analizando posteriormente cada muestra macro y microscópicamente como se describe en materiales y métodos.

a) MEDIOS POBRES.

Las características macro y microscópicas de las cepas analizadas, sembradas en medios pobres, se resumen y reportan en las tablas no. 3, 4, 5, 6 y 7; describiéndose su desarrollo colonial, producción de pigmento, producción de macroconidias, producción de microconidias y producción de clamidiosporas respectivamente.

Tabla No. 3
DESARROLLO COLONIAL

SUSTANCIA	g	Microsporum canis	Microsporum canis dyssonic
D(+)-Xilosa	2.5, 5 y 10	+++	+++
L(+)-Arabinosa	2.5 5 10	++ ++ ++	++++ ++++ ++
Dextrosa	2.5, 5 y 10	++++	++++
D(+)-Manosa	2.5, 5 y 10	++++	++++
D(-)-Fructosa	2.5, 5 y 10 10	++++ ++	++++ ++
Sacrosa	2.5, 5 y 10	+++	++
Lactosa	2.5, 5 y 10	++	++
Maltosa	2.5, 5 y 10	++++	+++
Rafinosa	2.5, 5 y 10	+++	++
Galactosa	2.5, 5 y 10	+++	+++
L-Cisteina	2.5	++	++
Tiamina	2.5 y 5 10	++ n.c.	++ ++

n.c. No crecio
 ++ Poca cantidad.
 +++ Regular cantidad.
 ++++ Abundante cantidad.
 +++++ Muy abundante cantidad.
 ++++++ Gran cantidad.

CUADRO No. 8

DESARROLLO COLONIAL

SUSTANCIA	N	C. RAZIA	C. RAZIA SYRISIACA
D(+)-Xilosa	2.8, 8y10	+++	+++
L(+)-Arabinosa	2.8y8 10	++ ++	++++ ++
Dextrosa	2.8, 8y10	++++	++++
D(+)-Manosa	2.8, 8y10	++++	++++
D(-)-Fructosa	2.8y8 10	++++ ++	++++ ++
Sacarosa	2.8, 8y10	+++	++
Lactosa	2.8, 8y10	++	++
Maltosa	2.8, 8y10	++++	++++
Rafinosa	2.8, 8y10	+++	++
Galactosa	2.8, 8y10	+++	+++
L-Cisteina	2.8	++	++
Timina	2.8y8 10	++ n.e	++ --

n.e. No creció
 + Poca cantidad
 ++ Regular cantidad
 +++ Abundante cantidad
 ++++ Muy abundante cantidad
 +++++ Gran cantidad

CUADRO No. 4

PRODUCCION DE PIGMENTO

SUSTANCIA	M. SARDIA			M. SARDIA ALBERCINO		
	2.5X	5X	10X	2.5X	5X	10X
D(+)-Arabinosa	+	+	+	-	-	-
L(-)-Arabinosa	-	-	-	+	+	-
Dextrosa	+	+	+	++	++	++
D(+)-Manosa	+	+	+	++	++	++
D(-)-Fructosa	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	-
Lactosa	+	+	+	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	uu	+	-	-
L-Cysteina	-	ne	ne	-	ne	ne
Tiamina	-	-	-	-	-	-

- No presencia

ne No especifica

+ Color amarillo-naranja brillante

++ Color amarillo oscuro

CUADRO No. 8

PRODUCCION DE HADROCOONIDAS

SUSTANCIA	N	C. SANTA	C. SANTA VERDEGALIA
D(+)-Xilosa	2.0	+	-
	5	++++	+
	10	+	++++
L(+)-Arabinosa	2.0	-	++++
	5	++	++++
	10	+	++
Dextrosa	2.0	+	++++
	5	+	++++
	10	-	++++
D(+)-Mannosa	2.0	++++	++++
	5	-	++++
	10	-	++++
D(-)-Fructososa	2.0	-	++++
	5	-	++++
	10	++++	++++
Lactosa	2.0	+	+
	5	-	+
	10	++++	-
Oxalacetato	2.0	-	++++
	5	-	++++
	10	+++	+
Tiamina	2.0	-	++++

- No presente
 + Poca cantidad
 ++ Regular cantidad
 +++ Abundante cantidad
 ++++ Muy abundante cantidad
 +++++ Gran cantidad

DAMAZO No. 6

PRODUCCION DE MICROORGANISMOS

SUSTANCIA	%	M. CALDA	M. CALDA SUSTRATO
L(+)-Arabinosa	2.5	-	-
	5	-	+
Dextrosa	5	-	+
	10	-	+
D(-)-Fructuosa	2.5	-	++++
	5	-	+++
	10	-	+
Timina	2.5	-	+++
	5	-	++++
	10	-	++++

- No presencia
 + Poca cantidad
 ++ Regular cantidad
 +++ Abundante cantidad
 ++++ Muy abundante cantidad
 +++++ Gran cantidad

QUADRO No.7

PRODUCCION DE CLAMIDIOSPORAS

SUSTANCIA	N	M. RAJE	M. RAJA ESCURRIDA
D(+)-Xilosa	2.0	++++	++++
	8	+	++++
L(+)-Arabinosa	2.0	++++	+
	8	++++	-
	10	-	++++
D(+)-Manosa	2.0	+++	+
RAFINOSA	2.0	++++	++
	10	++++	++
D(-)-Fructosa	2.0	-	++++
LACTOSA	2.0	+	++++
TIAMINA	2.0	++++	+
	8	+++	+

- No presencia
 + Poca cantidad
 ++ Regular cantidad
 +++ Abundante cantidad
 ++++ Gran cantidad

b) MEDIOS RICOS.

La cepa de M. canis se observó normal en sus características macro y microscópicas, desarrollando una colonia blanca vellosa, una producción de pigmento amarillo a su reverso y características microscópicas típicas de la cepa. M. canis dysgónico presentó una colonia adherida al medio, color ocre y una producción de pigmento amarillo más oscuro que la cepa normal al reverso de la colonia; solo en medios a las 3 concentraciones de dextrosa (2, 4 y 8%) más 8% de harina de arroz presentó además de lo anterior pequeñas zonas vellosas. La cantidad de macroconidias producidas fue buena pero no tan abundante como en el medio de granos de arroz.

El desarrollo de ambas cepas en función de las diferentes condiciones de los medios fue igual, mostrando las siguientes características.

-No se observó diferencias en función de las distintas concentraciones de polipeptona.

-Se obtuvo un mejor crecimiento a medida que aumenta la concentración de harina de arroz.

-A las 3 concentraciones de dextrosa (2, 4 y 8%) más 8% de harina de arroz se obtuvo un mejor crecimiento comparada con todas las demás condiciones.

La cepa de M. canis dysgónico microscópicamente mostró diferencias significativas en estos medios, como por ejemplo en el medio compuesto de harina de arroz al 4% y polipeptona al 5% únicamente se obtuvo micelio vegetativo con características dysgónicas mezclado en menor proporción con micelio normal. En

las concentraciones restantes de harina de arroz y polipeptona se observó además de lo anterior, muy pocas macroconidias cuya forma y septos eran aparentemente normales pero su ornamentación era muy marcada, como se observa regularmente en la cepa atípica de M. canis. Finalmente en los medios que contenían dextrusa al 2, 4 y 8% más harina de arroz al 8%, la cantidad de macroconidias producidas fue muy grande mostrando características dysgónicas en una alta proporción de éstas (más del 50%) además de micelio dysgónico y normal.

DESCRIPCION MORFOLOGICA DE M. canis y M. canis dysgénica
UTILIZANDO MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Las cepas se crecieron por la técnica de microcultivo y se procesaron para su observación para microscopia electrónica de barrido como se describe en materiales y métodos.

La cepa de M. canis mostró las mismas características microscópicas descritas, utilizando microscopia óptica; con la ventaja que el mayor aumento y resolución que proporciona la microscopia electrónica de barrido nos permitió observar detalles morfológicos que no pueden ser vistos con microscopia de luz.

En una colonia joven de M. canis de 7 a 9 días de evolución (figura no. 3) las hifas son finas presentando en algunas partes engrosamientos y algunas protuberancias pequeñas de forma redonda y ovalada. Las macroconidias, son de diferentes tamaños presentando una forma alargada, finas y con su extremo distal afilado. En su superficie en algunos casos presenta algunas verrucosidades finas repartidas a todo lo largo, en otras ocasiones se observan esferas grandes que dan la apariencia de gotas de agua cuya superficie es lisa (parecidas a las de la cepa atípica de M. canis de la figura no. 11 pero de menor tamaño); y finalmente algunas macroconidias presentan ambos tipos de ornamentación. En colonias de 30 días de desarrollo las hifas conservan las mismas características de la cepa de 15 días (figura no. 4) pero las macroconidias se han desarrollado más, mostrando una forma navicular alargada con extremos afilados, con numerosos septos observados como relieves en forma de anillos y cuyo número generalmente es de 8 a 10, en su superficie solo se

observan verrucosidades pequeñas uniformemente distribuidas y que se concentran en mayor número en ambos extremos.

En cultivos viejos de 2 a 3 meses de desarrollo las macroconidias muestran numerosas verrucosidades que en su mayoría se reparten uniformemente en toda su superficie. Aun cuando conservan su forma navicular estas son mas anchas y ya no se aprecian los relieves septales (figura no. 6). Notese que las verrucosidades dan la apariencia de pequeños globos semidesinflados que pudieran ser originados de las esferas con apariencia de gota de agua de las macroconidias jóvenes.

La cepa de M. canis dysgónica únicamente presentó micelio vegetativo dysgónico cuyas características son claramente diferentes a la cepa de M. canis (compare la figura no. 4 y no. 7). Como se aprecia en la figura no. 7 las hifas son mas gruesas y heterogéneas en forma comparadas con la cepa normal, presentando desde hifas con una forma tubular continua, nodulaciones, ensanchamientos de diferentes formas y dimensiones, protuberancias amorfas sobre de éstas, ramificaciones en diferentes direcciones, hasta engrosamientos amorfos de los cuales salen varias hifas en distintas direcciones. La morfología en general es muy heterogénea y el crecimiento da la impresión de estar atrofiado lo que podría dar lugar a tal gama de formas distorsionadas y un crecimiento con apariencia tipo coral.

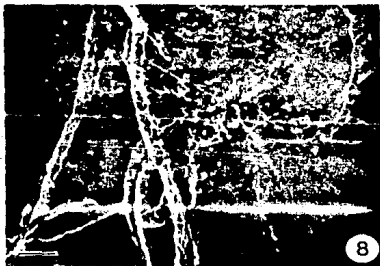
Como se explicó anteriormente su inestabilidad en cultivo se manifiesta como cepa atípica de M. canis presentando una combinación de hifas, tanto dysgónicas (como las que se ven en la figura no.8) como de hifas aparentemente normales (flecha de la

figura no. 8) y una fase intermedia entre estas (cabeza de flecha de la figura no. 8 y 9); estas últimas aun cuando presentan una forma tubular continua son mas gruesas que las hifas normales, algunas presentan ornamentaciones amorfas sobre su superficie (flecha gruesa de la figura no. 8) y otras sus ramificaciones se observan orientadas en diferentes direcciones. Estas cepas mostraron la presencia de macroconidias; las cuales en algunos casos presentaron una forma aparentemente normal pero que en su mayoría su morfología fue atípica (como las que se describen mas adelante) e incluso en algunos casos totalmente distorsionada sin seguir un patrón definido, tal es el caso en la figura no.8 en que se observa lo que podria ser una macroconidia o una hifa en un muy alto grado de distorsión sin poderse definir con seguridad a que estructura corresponde, pero que al parecer tiende a ser una macroconidia con una distorsión extrema a juzgar por el tipo de ornamentación que presenta, propia de una macroconidia. En posteriores resiembras la cantidad de hifas con características aparentemente normales aumenta considerablemente, sin embargo la mayor parte de éstas tienen algunas características que las distinguen de las hifas de M. canis (y que no pueden ser vistas por microscopía óptica); como por ejemplo el que están, ornamentadas con pequeñas esferas (flecha de la figura no. 10), característica que llegó a observarse en muy baja frecuencia en la cepa de M. canis mientras que en la cepa atípica se observó en mucho mayor proporción; por otro lado algunas hifas mostraron en su superficie (flecha de la figura no. 11) una ornamentación en forma de espinas que no fue observada en la cepa normal de M.

canis; en estas preparaciones la cantidad de macroconidias es mucho mayor igualandose en número con la cepa de M. canis; de éstas algunas mostraron características morfológicas aparentemente normales mientras que otras; al igual a los observado con microscopía de luz, presentaron malformaciones en diferente grado; las que iban desde una forma navicular pero, con su extremo distal curvo (figura no. 9, 12 y 14) o bifurcado (figura no. 13); otras en forma de "8" (figura no. 11) y algunas otras como una estructura atrofiada en su desarrollo que dio origen a una macroconidia pequeña sin la forma navicular característica y con su extremo distal curvo (figura no. 10) entre otras morfologías. La proporción entre macroconidias con características normales y atípicas varió entre resiembras predominando las atípicas en las primeras resiembras y las normales en las posteriores resiembras (como también se observó con microscopía de luz). En cultivos de 20 a 30 días de desarrollo, en las macroconidias se observan septos como relieves en forma de anillo que van de 1 a 5 en la mayoría de las macroconidias con forma atípica (figura no. 10) y de 8 a 10 en aquellas con morfología aparentemente normal. Finalmente la ornamentación de las macroconidias presentó gran diferencia con respecto a la cepa normal; ya que la cepa atípica, se caracterizó por mostrar una gran heterogeneidad en la morfología y dimensiones de su ornamentación incluyendo a las macroconidias con forma aparentemente normal, por ejemplo: en algunos casos fue de tipo verrucosa pero su distribución y tamaño no sigue un patrón definido entre las macroconidias (figura no 8-14), en

otros casos se observó como esferas de muy diversos tamaños que a pesar de ser parecidas estas estructuras a las observadas en cultivos jóvenes (15 días) de M. canis estas permanecieron tanto en cultivos maduros (figura no.11) como viejos de la cepa atípica y su número y tamaño fue mayor, además de que su patrón de distribución al igual que los demás tipos de ornamentación fue muy irregular; por último, se observaron un tipo de estructuras que nunca fueron vistas en la cepa de M. canis y que en la cepa atípica se presentaron en un número de 1 a 3 por macroconidia y en general en baja proporción, las cuales consistían en 2 esferas una sobre de otra y en la última le sale una estructura en forma de mechón como se puede ver en la figura no. 14. En general las macroconidias de la cepa atípica de M. canis presenta una ornamentación mas marcada y tosca que la cepa normal de M. canis.

La cepa atípica de M. canis produjo microconidias en forma de clava o piriformes normales, solo que en un número mayor a la cepa normal.



PIEB DE FIGURA

Figura no. 4.- Micelio y Macroconidias de M. canis/M.E.B.
Cultivo de 15 días de evolución. Las hifas son finas, presentando algunos engrosamientos. Las ramificaciones son en un mismo sentido. Las macroconidias son de forma navicular alargada con sus extremos distales afilados. Se observan numerosos relieves septales. Presentan una ornamentación de tipo verrucosa mas evidente en los extremos.
Aumento 1000X. Barra 1 um.

Figura no. 5.- Macroconidia de M. canis/M.E.B.
Macroconidia joven, cultivo de 7 a 9 días, que se caracteriza por su forma navicular delgada con sus extremos distales muy afilados. Se observan relieves septales de 6 a 10 y su superficie presenta verrucosidades que se concentran en los extremos.
Aumento 1000X. Barra 1 um.

Figura no. 6.- Micelio y Macroconidias de M. canis/M.E.B.
Cultivo de mas de 40 días de desarrollo. El micelio es aparentemente igual en morfología que el observado en la figura no. 4 con la diferencia de tener una apariencia menos rigida. Estas macroconidias en su desarrollo, conservan su forma navicular pero son mas anchas. La mayoría presenta toda su superficie cubierta de verrucosidades de tamaño y forma muy similar, concentrandose ligeramente en los extremos. A esta edad ya no se observan los relieves septales.
Aumento 450X. Barra 10 um.

Figura no. 7.- Micelio de M. canis dysgónico/M.E.B.
Cultivo de 15 días de evolución. El micelio es muy heterogéneo en su morfología y dimensiones. Es mas grueso que el micelio de M. canis, sus ramificaciones se observan en diversas direcciones e incluso hay engrosamientos amorfos de los cuales surgen varias hifas en diferentes direcciones. Con frecuencia se observan hifas con una apariencia de varias esferas unidas. En su superficie presenta ornamentaciones de varios tipos que van desde verrucosidades como pequeñas esferas, esferas mas grandes ; hasta verrucosidades amorfas de diferentes tamaños. Su apariencia en general es de tipo coral. No muestra desarrollo de macroconidias.
Aumento 700X. Barra 10 um.

Figura no. 8.- Micelio de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.
Cultivos de 15 días de evolución. Presenta una mezcla de micelio normal (en dimensiones y morfología) y de tipo dysgónico en cuyo caso es mas grueso que el normal, se le observa con frecuencia relieves septales y su superficie es rugosa presentando ornamentación de tipo verrucosa de diferente morfología y tamaño. Pierde la apariencia tipo coral de la cepa de M. canis dysgónico de la cual proviene.

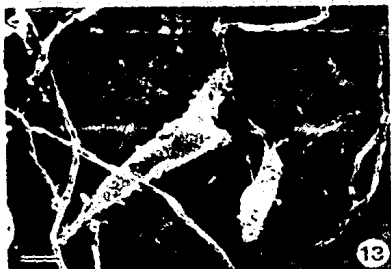
Se observan formas tan distorsionadas de las que no se tiene la certeza de tratarse de una hifa o una macroconidia con un muy alto grado de distorsión que a juzgar por su ornamentación pensamos se trata de una macroconidia dysgónica.

Aumento 1000X. Barra 1 um.

Figura no. 9.-Micelio y Macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.

El micelio de esta cepa presenta básicamente las mismas características de la fotografía no. 8 pero la proporción de micelio aparentemente normal aumenta en el transcurso de las resiembras. Se observa una macroconidia dysgónica con una apariencia seminavicular y su extremo distal curvo, el cual está cubierto con verrucosidades. La flecha muestra hifa reflexiva.

Aumento 1000X. Barra 1 um.



PIEB DE FIGURA

Figura no. 10.-Micelio y Macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.

El micelio presenta una mayor proporción de características normales como grosor, dirección, etc; pero con frecuencia se le observó ornamentación de diferentes tipos nunca vista en la cepa normal, algunas de estas; como la vista en esta micrografía que presenta ornamentación tipo piriforme. También se muestra una macroconidia aparentemente atrofiada en su desarrollo con un pedículo de inserción muy grueso, su extremo distal curvo y un número de 3 a 4 relieves septales.

Aumento 1500X. Barra 1 um.

Figura no. 11.-Micelio y Macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.

Se observa una macroconidia que además de su extremo distal curvo presenta ornamentación muy heterogénea en forma y dimensiones presentando desde esferas pequeñas hasta un tamaño de aproximadamente 10 veces las anteriores, algunas de las cuales se mostraron como globos desinflados y otras se les vio unidas a la superficie de la macroconidia a través de un pedículo de inserción. Notese la diferente ornamentación del micelio tanto en forma de pequeñas protuberancias como en forma de espinas.

Aumento 3000X. Barra 1 um.

Figura no. 12.-Micelio y Macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.

Macroconidia delgada con su extremo distal curvo sin la forma navicular característica y ornamentación heterogénea en distribución. Note las diferencias en la ornamentación de las macroconidias uledañas no siguiendo el patrón característico aun cuando presentan la forma navicular de M. canis.

Aumento 1000X. Barra 1 um.

Figura no. 13.-Micelio y Macroconidias de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.

Macroconidia con su extremo distal bifurcado, cuya heterogéneidad en ornamentación es muy marcada.

Aumento 1000X. Barra 1 um.

Figura no. 14.-Macroconidia de la cepa atípica de M. canis/M.E.B.

Macroconidia con extremo distal curvo y ornamentación poco común en esta cepa y nunca vista en M. canis formada por dos esferas una sobre otra unidas directamente sobre la superficie de la macroconidia y cuyo extremo distal presenta una estructura con forma de mechón. Esta ornamentación fue vista en un número de 1, 2 o 3 y cuando se observaron 2 como en esta micrografía fueron bilateralmente simétricas.

Aumento 3000X. Barra 1 um.

**HALLAZGO DE PARTICULAS VIRALES EN LA CEPA DE M. canis
dysgénico.**

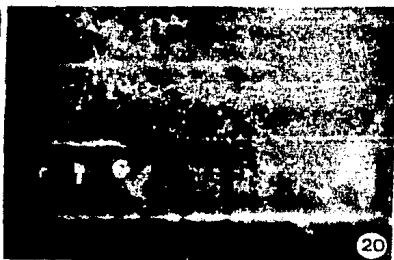
La preparación de las muestras para su observación en microscopía electrónica de transmisión se dividió en dos etapas; la primera consistió en hacer tinciones negativas del sobrenadante de cultivo líquidos (SDL) de las cepas de M. canis M. canis dysgénico y la segunda, en incluir en resina muestras de cultivos de 15 a 30 días de desarrollo en medios de SDA y medio de arroz; de las 2 cepas, observando cortes ultrafinos de éstas por microscopía electrónica de transmisión; como se describe en materiales y métodos.

En las observaciones de las preparaciones hechas por tinción negativo se encontró que en el sobrenadante del medio de cultivo líquido de M. canis dysgénico y en su estadio de cepa atípica de M. canis, contenía dos tipos de partículas virales con una estructura icosaédrica alargada como puede verse en la figura no. 15 y 16, estas partículas virales presentaban (cuando se observan al parecer íntegras) un cuerpo de tipo tubular unido a la cabeza del virus (figura no. 17). Casi la totalidad de estos cuerpos tubulares se encontraron separados de la cabeza y unidos entre ellos formando grandes polímeros alrededor de los cuales se localizaron un gran número de cabezas de partículas virales (figura no. 15).

El sobrenadante del medio de cultivo de la cepa de M. canis fue negativo al hallazgo de estas partículas virales, al igual que los cortes ultrafinos de este hongo.

Las observaciones de cortes ultrafinos de la cepa de M.

canis dysgónico y cepa atípica de M. canis permitió la observación de estas partículas virales parasitando las hifas del hongo. Estas partículas se localizaron en el interior de las hifas y la pared de las mismas. Cuando se encontraban en el interior, se observaron en cualquier parte, sin mostrar preferencia por alguna estructura interna en particular (figura no. 19); sin embargo la cantidad de partículas virales observada fue mayor en la pared celular de la hifa que en su interior (figura no. 18 y 20). También fueron observadas estas partículas virales completas sobre la superficie externa de la hifa en una posición con el cuerpo sobre la superficie.



PIES DE FIGURA

Figura no. 15.-Tinción negativa del sobrenadante del medio de cultivo BDL de M. canis dysgónico/M.E.B.

Se observaron dos tipos de partículas virales de forma icosaédrica alargada (flecha) y un gran número de cuerpos de estos micófitos asociados formando grandes polímeros.

Figura no. 16.-Tinción negativa del sobrenadante del medio de cultivo SDL de M. canis dysgónico/M.E.T.

Partículas virales de tipo icosaédrico alargado de dos diferentes tamaños, a mayor aumento que la micrografía anterior.

Figura no. 17.-Tinción negativa del sobrenadante del medio de cultivo SDL de M. canis dysgónico/M.E.T.

Partícula viral completa, observándose el cuerpo unido a la cabeza.

Figura no. 18.-Corte ultrafino de M. canis dysgónico/M.E.T.

Se observan las partículas virales vistas anteriormente por tinción negativa, parasitando el hongo; en citoplasma (flecha).

Figura no. 19.-Corte ultrafino de M. canis dysgónico/M.E.T.

Se observan las partículas virales en citoplasma, dentro de las vacuolas y en la pared celular.

Figura no. 20.-Corte ultrafino de M. canis dysgónico/M.E.T.

Se observan las partículas virales en la pared celular donde se observaron más comúnmente.

EFFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE LAS PARTICULAS VIRALES DEL SOBRENADANTE DE M. canis dysgónico, EN EL DEBARRILLO DE LA CEPA NORMAL DE M. canis.

El sobrenadante de cultivos en medio SDI de M. canis y de M. canis dysgónico de 30 días de desarrollo, se analizaron a través de tinciones por microscopía electrónica de transmisión. El cultivo de M. canis dysgónico se desarrolló como cepa atípica de M. canis. El sobrenadante de M. canis dysgónico se prefiltró en membranas de 0.45 μ m de poro y posteriormente se filtró a través de membranas de 0.22 μ m de poro. Una fracción de este sobrenadante se agregó a medio SDI fresco y se inoculó con micelio y macroconidias de M. canis observando su desarrollo y comportamiento durante el mismo y describiendo detalladamente sus características macro y microscópicas, al finalizar su desarrollo; al igual que en las cepas control de M. canis y de M. canis dysgónico, como se describe en materiales y métodos.

La tinción negativa hecha al sobrenadante de M. canis y de la cepa atípica de M. canis reveló la ausencia y presencia de partículas virales respectivamente, a través de microscopía electrónica de transmisión. Estas partículas presentaron una estructura icosaédrica alargada de dos diferentes tamaños (figura no. 15 y 16) como se describe en el inciso anterior.

El grado de desarrollo con respecto al tiempo en las cepas control (M. canis y M. canis dysgónico) y la cepa de M. canis mas el sobrenadante de M. canis dysgónico, fue muy similar, así como en la mayoría de sus características macroscópicas, observándose en éstas una textura aterciopelada con pliegues irregulares

creciendo con una apariencia acartonada sobre la superficie del medio; sin embargo se notaron algunas diferencias en las que la cepa de M. canis mas las partículas virales de M. canis dysgónico mostró una mayor similitud con esta última (que se manifestó como cepa atípica de M. canis) que con la cepa de M. canis como por ejemplo, una colonia de color ante mas oscuro, una apariencia acartonada mas pronunciada y un pigmento en el medio mas oscuro que el observado en la cepa de M. canis.

Las características microscópicas de las tres cepas analizadas, a través de tinciones con azul de algodón lactofenol mostraron que las cepas de M. canis y cepa atípica de M. canis tienen las mismas características observadas en medio SDA descritas en el primer inciso de resultados (Descripción morfológica detallada de M. canis y M. canis dysgónico en su primoaislamiento y a través de varias resiembras, utilizando microscopía de luz) y que corresponden a la morfología que las caracteriza a cada una de ellas.

La cepa de M. canis mas las partículas virales del sobrenadante de la cepa de M. canis dysgónico presentó características microscópicas propias de la cepa atípica de M. canis (descritas detalladamente al inicio de este capítulo) observandose micelio vegetativo aparentemente normal y en menor proporción micelio dysgónico, macroconidias con forma, ornamentación y septos normales y un menor número de macroconidias tipo dysgónico que se caracterizaron por presentar alteraciones morfológicas como extremo distal curvo y macroconidias en forma de "S" entre otras malformaciones, el

número de septos varió de 1 a 6 y su ornamentación se observó mas pronunciada que la de la copa normal.

VII. DISCUSION.

La descripción morfológica detallada, de M. canis y M. canis dysgónico en su primocultivo y durante sus resiembras utilizando microscopia de luz (cuadro no. 1 y 2) nos dan principalmente dos tipos de información, en primer lugar, las diferencias morfológicas (macro y microscópicas) que clasifica como cepas diferentes a M. canis y M. canis dysgónico y en segundo lugar el poder relacionarlas en torno a la cepa de M. canis.

El análisis de M. canis dysgónico en este experimento muestra que sus características macro y microscópicas son diferentes no solo a la cepa de M. canis (Figura no. 1, 2 y 3) si no también a los demás tipos de dermatofitos; características que en caso de ser estables en la cepa, sería difícil relacionarla con una especie específica de dermatofito. Sin embargo, el hecho de que esta cepa es inestable en cultivo (Cuadro no. 2) produce una cepa atípica de M. canis que se caracterizó entre otras estructuras en el desarrollar macroconidias propias de M. canis, lo que nos permite relacionarla con esta especie del género Microsporium. Las notables diferencias morfológicas entre las resiembras y el primocultivo hace necesario diferenciar estos dos distintos estadios por lo que se ha denominado en un caso cepa atípica de M. canis, caracterizada principalmente por presentar macroconidias tanto normales como dysgónicas (extremo distal curvo, forma de "S" etc.) y micelio normal y dysgónico (hifas mas gruesas, ensanchamientos, distorsionadas, reflexivas, etc.) entre

otras características; y en el otro M. canis dysgónico obtenido en el primocultivo y en las dos primeras resiembras y que su característica principal es el producir colonias totalmente carentes de macroconidias y cuyo micelio vegetativo está distorsionado comparado con la cepa normal de M. canis, además de producir hifas reflexivas; por ello, en este trabajo los hemos llamado con estos nombres que concuerdan y describen en pocas palabras las características que los distinguen y que ya antes se han reportado con estos nombres con los mismos fines (17, 18, 19).

La mayoría de los reportes, concuerdan, al igual que lo encontrado en este trabajo, que la cepa de M. canis dysgónico es muy inestable en cultivo (17, 18, 42), dando origen a colonias atípicas que producen macroconidias normales de M. canis y macroconidias distorsionadas llamadas dysgónicas. Como puede verse en el Cuadro no. 2 al paso de las resiembras la cepa tiende a aumentar la proporción de características normales e incluso como se dijo en resultados a dar una cepa aparentemente normal en la 6a. resiembra en medio de granos de arroz; resultado que ya ha sido reportado en la literatura, donde a partir de una cepa con características de M. canis dysgónico en la 1er. resiembra en medio de granos de arroz se obtiene una cepa con características microscópicas típicas de M. canis (42). Este comportamiento origina varias preguntas, como; en que magnitud es inestable la cepa por ella misma, o si al resembrar se está seleccionando una u otra característica, ya que como observamos el porcentaje de macroconidias y otras características atípicas no decrece

siguiendo un patrón determinado; pudiendo deberse a que en el momento de la resiembra el inóculo tomado de un determinado sitio de la colonia con una u otra característica influye entre otros factores, en el fenotipo de la nueva progenie. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde al resembrar cultivos de M. canis dysgónico de diferentes partes de su colonia se obtuvo en algunos casos cepas típicas de M. canis, en otros cepas atípicas de M. canis y en otros cepas de M. canis dysgónico (18). Sin embargo, es clara la inestabilidad de la cepa; independientemente de su comportamiento durante sus resiembras, ya que desde el primoincubamiento al envejecer éste, en algunas zonas de la colonia desarrolló cepas atípicas; e incluso, al analizarlo microscópicamente desde que los cultivos eran jóvenes, se observó micelio aparentemente normal del que se originaba micelio dysgónico y viceversa, observaciones también encontradas en otros trabajos (19), por lo que sería de esperar el posterior desarrollo de las cepas atípicas conteniendo características aparentemente normales mezcladas con atípicas. En este trabajo el inóculo fue tomado al azar y de cultivos maduros; por lo que creemos se pudo favorecer el crecimiento de cepas atípicas en los diferentes medios y típica de M. canis en la 6a. resiembra en granos de arroz.

Para llevar a cabo una comparación más precisa que la obtenida por M.O.; de la morfología de M. canis, M. canis dysgónico y cepa atípica de M. canis se realizó un análisis ultraestructural de las tres diferentes cepas a través de Microscopía Electrónica de Barrido, encontrando diferencias

morfologías importantes que no pueden ser vistas a través del microscopio de luz. Como se describe detalladamente en resultados la cepa de M. canis mostró las mismas características vistas por microscopía de luz, pero se pudo distinguir y seguir mas detalladamente los cambios que sufre la cepa durante su desarrollo hasta su vejez principalmente en lo que se refiere a las estructuras de su ornamentación y poder dar una idea mas clara de la morfología, dimensiones y distribución de las mismas; basandonos en estas observaciones se desarrolló un esquema donde se resume lo que consideramos constituye el desarrollo morfológico de M. canis desde el inicio de su crecimiento hasta su vejez reportado en la figura no. 21. Igual que como se hizo para M. canis, se desarrolló un esquema donde se resume el desarrollo morfológico de M. canis dysgónico y de la cepa atípica de M. canis reportado en la figura no. 22.

El análisis de los resultados del estudio morfológico hecho por M.O. y M.E.B. de las 3 cepas junto con los esquemas deducidos de estos resultados, confirma las diferencias morfológicas entre M. canis y M. canis dysgónico, y la subdivisión de esta última en cepa atípica de M. canis como consecuencia de su inestabilidad en cultivo, permitiendo clasificarla como cepas distintas y que cuya relación con M. canis las podemos denominar como cepas variantes de M. canis.

Existe un gran número de reportes de cepas atípicas de M. canis en diferentes partes del mundo y de diferentes fuentes (humano, mono, etc.) (17, 18, 19, 34, 42) por lo que se hace indispensable el tratar de averiguar cuales son los orígenes y

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

causas de este tipo de alteración, por dos razones principales entre otras; por un lado por la importancia en el mecanismo y en la biología molecular del fenómeno en si, y por el otro; por las implicaciones y trascendencias clínicas que pudieran provocar este tipo de alteraciones, ya que como se reporta en la literatura (42), cepas con las mismas características, denominada como M. canis lampiño ha llegado a representar una tercera parte del total de los aislamientos de M. canis causante de tija corporis, en un estudio epidemiológico hecho en Gran Bretaña; y a pesar de que las manifestaciones clínicas que causa la infección son iguales a las causadas por M. canis, se desconoce si pueda producir en un futuro mayores alteraciones o si las esta causando sin ser detectadas aún.

El estudio de resiembra progresivas en medio SDA de M. canis dysgónico (Cuadro no. 2) a partir de su primoaislamiento en medio Micobiotic muestra un cambio de una cepa con características atrofiadas no solo a nivel morfológico de las estructuras que desarrolla la cepa normal y de su crecimiento, si no también; fenotípico ya que por alguna razón se ve impedida la esporulación asexual del hongo en el primoaislamiento y en las primeras resiembras; así como de micelio y macroconidias normales y atípicas de M. canis en diferentes proporciones en SDA; su aparición inmediata de las características en la 1er. resiembra en medio de arroz y la obtención de la cepa con características de M. canis en la 6a. resiembra en granos de arroz; originó la pregunta de si este tipo de alteración pudiera deberse o estuviere en función de distintas condiciones nutricionales; por

lo que se procedió a un segundo experimento donde se analizó el comportamiento de la cepa de M. canis y M. canis dysgénico en distintas condiciones nutricionales; dividiéndose básicamente en dos tipos de medios: 1) Medios pobres y 2) Medios ricos.

Como pueda verse en resultados, la cepa de M. canis y M. canis dysgénico tanto en medios pobres como en medios ricos conservan sus características propias de cada una, haciendo la observación que en medios pobres y en la mayoría de los ricos M. canis dysgénico se manifestó macro y microscópicamente como cepa atípica de M. canis. En medios pobres el desarrollo colonial (Cuadro no. 3) varió entre los diferentes nutrientes y concentraciones de los mismos teniendo un mejor desarrollo M. canis en dextrosa, manosa y fructosa y la cepa atípica de M. canis a estas mismas más arabinosas; lo que es interesante resaltar es la relación que hay entre este buen desarrollo colonial y la producción de macroconidias (Cuadro no. 5) ya que la cepa de M. canis tuvo en general una baja producción de macroconidias comparada con la cepa atípica, lo que pudiera sugerir que esta última tienen requerimientos nutricionales menos estrictos para una buena esporulación, de igual manera la producción de microconidias (Cuadro no. 6) en la cepa atípica fue no solo positiva en algunos medios si no incluso muy abundante en tiamina y en menor grado en dextrosa y fructuosa mientras que la cepa de M. canis fue aparentemente negativa en todos estos medios a la producción de estas estructuras, lo anterior muestra que en unos casos la expresión y en otros la mejor expresión de un fenotipo dado en la cepa atípica de M. canis que en M. canis bajo

las mismas condiciones nutricionales que la cepa atípica, observando que no solo hay diferencias en su fenotipo si no también muestra una mayor o tal vez mejor expresión genética de la cepa atípica de M. canis en estos medios. Además corroborar que los carbohidratos son el nutriente principal para el buen desarrollo de las cepas mas que los aminoácidos y vitaminas, como se ha observado anteriormente (2). La producción de pigmento en medio SDA siempre fue diferente en ambas cepas (amarillo brillante en M. canis y amarillo oscuro en M. canis dysgénico y cepa atípica de M. canis en medio Micobiotic y SDA) lo que muestra que existen también diferencias entre estas a nivel bioquímico. En este estudio (Cuadro no. 4) se encontró una mayor sensibilidad en la cepa atípica que en la típica de M. canis a los diferentes nutrientes y a las concentraciones de los mismos en donde el metabolismo para la producción del metabolito responsable de la pigmentación al reverso de la colonia, en algunos casos fue igual a la cepa normal, en otros negativo, y en otros amarillo oscuro característico de M. canis dysgénico; lo que da pauta a una futura caracterización bioquímica, además de ser un cambio que posiblemente aclare las diferencias en la expresión genética a nivel metabólico de las cepas.

El comportamiento de M. canis y M. canis dysgénico sembrados en estos diferentes medios en donde ambas cepas conservaron sus características propias y que en ninguna de las condiciones nutricionales, ni una ni otra de las cepas revirtió al fenotipo de la contraria, elimina la posibilidad de deberse la alteración de M. canis dysgénico y su cambio a M. canis en medio de granos.

de arroz, a condiciones nutricionales al menos en las condiciones usadas en este experimento. Estos resultados se ven apoyados por los datos encontrados en la literatura (10) donde al usar medios compuestos con una de varias vitaminas y libres de agar base no encuentran cambios en las características de la cepa atípica de M. canis.

Si el cambio de M. canis dysgónico a cepa atípica de M. canis en medio SDA, medios pobres y medios ricos y a cepa normal de M. canis en la 6a. resiembra en medio de granos de arroz, está influenciada o determinada por condiciones nutricionales, no está claro aun, ya que tanto los medios pobres como los medios ricos fueron sembrados a partir de la misma primer resiembra en SDA de M. canis dysgónico que presentaba las características propias de esta cepa, resultando; en SDA y en todos los medios pobres, en colonias atípicas de M. canis mientras que en medios ricos contrario a lo que se esperaba basandonos en los resultados encontrados en medios de granos de arroz, se obtuvo en algunas condiciones (harina de arroz al 4% más polipeptona al 5%) una cepa con características de M. canis dysgónico, en otras (en el resto de concentraciones de harina de arroz y polipeptona) micelio dysgónico y normal y una baja cantidad de macroconidias con características normales en forma y dysgónicas en ornamentación y finalmente en medio de arroz al 8% (concentración elegida por presentar una buen desarrollo colonial y una solubilidad adecuada) más dextrosa al 2, 4 y 8% , donde se obtuvo un desarrollo colonial excelente y sobre todo una producción de macroconidias muy abundante pero con una muy alta proporción con

características dysgónicas y atípicas en más del 50%, además de producir micelio dysgónico y normal. Estos resultados junto con los obtenidos en el análisis de las resiembras consecutivas en medio de SDA y medio de granos de arroz a partir de M. canis dysgónico indican que el mejor medio para el desarrollo de la cepa atípica de M. canis es el de harina de arroz al 8% mas cualquiera de las tres concentraciones de dextrosa (2,4 y 8%), siendo la dextrosa (comparando con la tabla no. 2,3 y 4) uno de los nutrientes esenciales para este efecto, que al parecer se ve aumentado por el harina de arroz al 8%; mientras que con harina de arroz al 4% mas polipeptona al 5% y la ausencia de un carbohidrato exógeno, es el medio en que M. canis dysgónico conservó mejor sus características; este comportamiento concuerda con los datos discutidos anteriormente y los amplía con respecto al comportamiento de M. canis dysgónico ya que esta última cepa parece tener requerimientos nutricionales menos dependientes de carbohidratos que la cepa atípica de M. canis y esta a su vez presentan requerimientos nutricionales menos estrictos a los de la cepa típica de M. canis. El comportamiento de las cepas en medios ricos reitera lo observado en el experimento de medios pobres, mostrando diferencias significativas en los requerimientos nutricionales de cada una, indicándonos que aparentemente su bioquímica es diferente así como sus requerimientos de los metabolitos usados para ello; observando que M. canis dysgónico depende mas de los metabolitos provenientes de fuentes proteicas (polipeptona) mientras que las cepas típica y atípica de M. canis dependen mas de carbohidratos

(dextrosa); mostrando una mayor similitud entre estas dos últimas. De cualquier manera aun cuando se ve cierta relación entre las cepas y el medio en que mejor desarrollan sus características fenotípicas no hay ningún dato conclusivo de esta relación, además de que sería necesario hacer resiembras sucesivas en estos medios para saber si concervan su fenotipo o lo modifican como se observó en el medio de SDA y de granos de arroz.

El hecho de que las alteraciones de M. canis dysgónico sean heredables pero que no sean constantes en futuras resiembras a pesar de que provienen de la misma parental; que esta cepa, por su inestabilidad en cultivo de origen a la cepa atípica de M. canis y que las alteraciones tanto en el micelio como en las macroconidias en la cepa atípica de M. canis no sean iguales entre ellas y sobre todo la variabilidad en la proporción de características atípicas y típicas en las diferentes resiembras, sugirió la presencia de un factor extracromosomal que pudiera mantenerse, valirse, transmitirse, heredarse, etc., afectando de diferente manera al hongo; lo que causaría, una gama de alteraciones (como lo que observamos) y no una sola si es que este tuviera un único sitio de unión al genoma, en donde permaneciera de manera estable etc, causando siempre la misma alteración. Estas características concuerdan con la posible presencia de DNA extracromosomal de origen viral que se incorpore al hongo dando como resultado alteraciones en el fenotipo original. Por estas razones se diseñó un experimento dirigido a la posibilidad de encontrar partículas virales en esta cepa, como

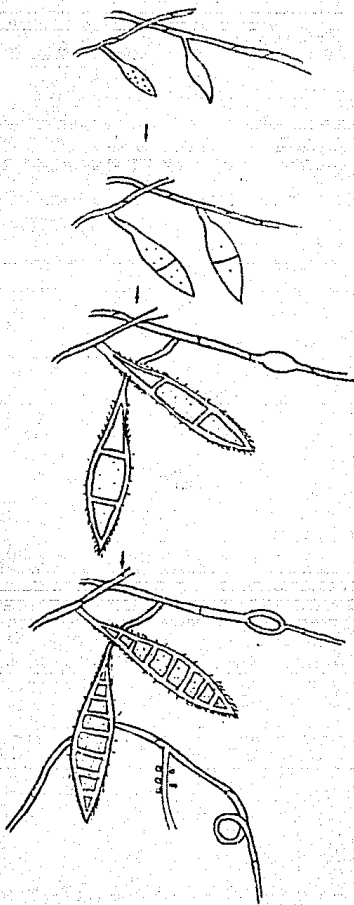
posibles responsables de su variación con respecto a la cepa normal de M. canis, utilizando para ello microscopía Electrónica de Transmisión. La presencia de virus en hongos conidiales, fue descubierta desde 1968 (11) al encontrar una actividad antiviral relacionada a cultivos de Penicillium stoloniferum (6) y Penicillium foniculosum (35) que los llevó a encontrar la primer evidencia de partículas virales y al descubrimiento de RNA de doble cadena de origen viral en hongos, en años posteriores la evidencia de virus en hongos, principalmente conteniendo RNA de doble cadena ha crecido substancialmente (11, 39) pero en todos los casos se trata de hongos saprófitos.

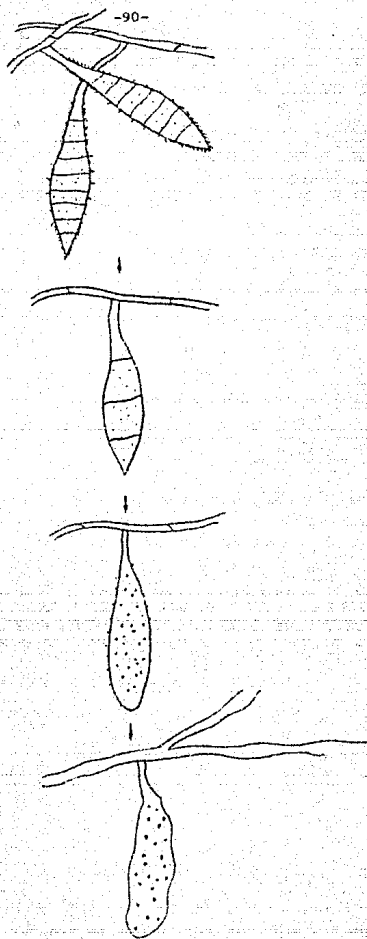
Por estas razones se diseñó un experimento para buscar virus en la cepa de M. canis dysgénico encontrando que el análisis a través de Microscopía Electrónica de Transmisión, reveló la presencia de partículas virales tanto en el sobrenadante del medio de cultivo como, parasitando este hongo, mientras que en la cepa de M. canis fue negativa a la presencia de estas partículas virales. Hallazgo que es de gran importancia no solo por ser el primer reporte de la presencia de partículas virales parasitando hongos patógenos directamente aislados de una infección fúngica, si no también por su posible relación en las alteraciones causadas en M. canis dysgénico y cepa atípica de M. canis; así como sus implicaciones en la patogenicidad del hongo, ya que de acuerdo a lo reportado (19) se encuentra, que las 3 cepas fueron capaces de causar infección en cuyes, produciendo las mismas manifestaciones clínicas y pudiendo reaislar las mismas cepas inoculadas de las lesiones, pero que fue necesario utilizar

diferentes inóculos en cada cepa, sugiriendo una variación en su virulencia.

La posible relación como causa directa o indirecta de las alteraciones en M. canis dysgénico y cepa atípica de M. canis se estudió en este trabajo, transfiriendo partículas virales purificadas del sobrenadante del medio de cultivo de M. canis dysgénico a un cultivo de M. canis en desarrollo; causándole a ésta, alteraciones propias de la cepa atípica de M. canis y comprobando así ser estas partículas virales la causa de las alteraciones de esta cepa y reiterando el hecho de que esta es una variante de M. canis. Estos hallazgos abren una serie de especulaciones en torno a estas partículas virales como, si estas pueden infectar cepas patógenas de diferentes hongos, lo que abriría la posibilidad de que en su genoma lleven algún fragmento de otro genoma fúngico que hallan infectado anteriormente, transportando características genéticas de una cepa a otra, pudiendo variar la patogenicidad y virulencia de estas cepas, ya sea por variaciones en la expresión o información genética del propio hongo permitiendo, evitando o amplificando la expresión de determinados genes del hongo o expresando fragmentos genómicos o genes provenientes de otros hongos que transporte el virus, por ejemplo: el imaginar una cepa de Aspergillus capaz de infectar vías respiratorias pero que al estar infectado por virus que al acarrear el gen que codifica para la enzima queratinasa proveniente de un dermatofito, le confiera esta propiedad queratinolítica, haría ha este hongo mucho mas agresivo de lo que es; entre otros muchos posibles ejemplos.

Estos resultados abren nuevas preguntas, como el porque de la inestabilidad de la cepa y cuales son los factores que determinan estos cambios, asi como en que momento la cepa adquiere las características de M. canis dysgónico o las de cepa atípica de M. canis o si se puede dar la transición de uno a otro en su habitud natural; ya que ambos estadios han sido aislados directamente de las lesiones clínicas (17, 18, 19, 34, 42); la relación virus-hongo, asi como las repercusiones de esta relación en la patogenia del hongo, la interacción del virus con el genoma del hongo, que determina la inestabilidad de M. canis dysgónico, que mecanismo utiliza para infectar, integrarse, causar un efecto y salir para infectar otras células, etc; así como la caracterización del virus; como saber que tipo de ácido nucleico tiene, su secuencia nucleotídica, etc; dejando un campo muy amplio de estudio que por su importancia requiere de la atención necesaria para continuar dicha investigación.

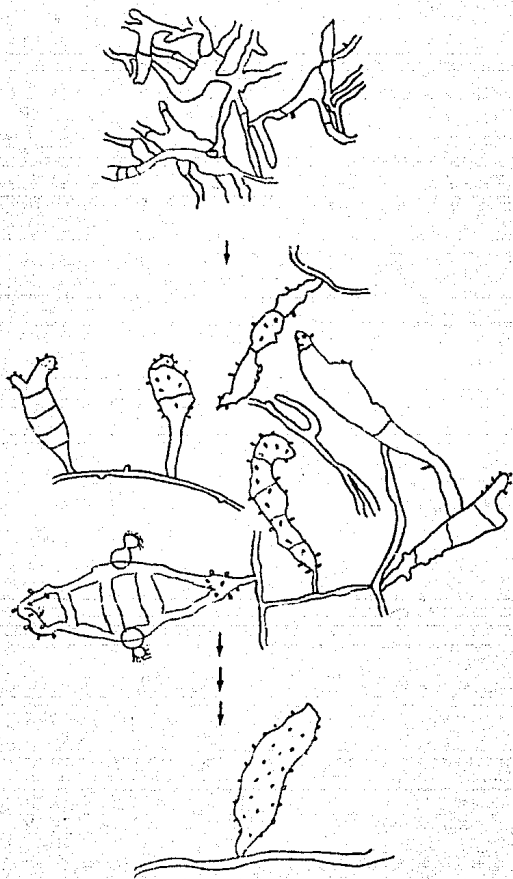




PIE DE FIGURA.

Figura no. 21.- Características microscópicas de M. canis durante su desarrollo en cultivo.

En base a las observaciones hechas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, durante el desarrollo de M. canis en cultivo, se propone este esquema que simplifica la variedad de estructuras observadas así como los cambios que sufren estas desde el inicio de su crecimiento hasta su muerte, descritos con detalle en resultados.



PIE DE FIGURA.

Figura no. 22.- En base a las observaciones hechas por microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido durante el desarrollo de M. canis dysgónico en cultivo, se propone este esquema que simplifica la variedad de estructuras observadas. Los cambios que sufren estas estructuras durante su desarrollo en cultivo básicamente siguen el mismo patrón que M. canis (figura no. 21) por lo que no se esquematizan con detalle en esta figura. En a) Se muestra la cepa de M. canis dysgónico que se obtiene en el primoinoculamiento en medio Micobiotic y primeras resiembra en SDA y que cuya característica principal es el presentar únicamente micelio dysgónico. La inestabilidad de esta cepa en cultivo da origen a b) Cepa atípica de M. canis que se caracterizó por presentar tanto micelio dysgónico como normal y macroconidias con características típicas de la cepa de M. canis ~~con~~ macroconidias con una amplia gama de malformaciones llamadas dysgónicas.

VIII. CONCLUSIONES.

- 1.-La cepa de M. canis dysgónico es inestable en cultivo así como durante sus resiembras, dando origen a una cepa con características morfológicas intermedias entre la cepa de M. canis y M. canis dysgónico, llamada cepa atípica de M. canis.
- 2.-El análisis de M. canis y M. canis dysgónico en diferentes condiciones nutricionales mostró que:
 - a) No es un factor que influya o determine las alteraciones vistas en M. canis dysgónico y cepa atípica de M. canis, en cuanto a los medios estudiados en este trabajo.
 - b) Los requerimientos nutricionales de las 3 cepas son diferentes; obteniéndose que el desarrollo de M. canis dysgónico depende principalmente de los metabolitos provenientes de fuentes proteicas (polipeptona), mientras que la cepa típica y atípica de M. canis dependen de carbohidratos (principalmente dextrosa).
 - c) Las diferencias en cuanto sus requerimientos nutricionales, la distinta sensibilidad a diferentes sustancias y concentraciones de las mismas y diferente producción de pigmentos excretados al medio de cultivo; indican diferencias significativas en la bioquímica de estas tres cepas.
- 3.-Tanto en el sobrenadante como parasitando el hongo se encontraron partículas virales en las cepas de M. canis dysgónico y cepa atípica de M. canis y su ausencia en la cepa de M. canis.
- 4.-La transferencia de partículas virales del sobrenadante de cultivos líquidos de M. canis dysgónico a cultivos líquidos de M. canis en desarrollo; dio como resultado cepas con características propias de la cepa atípica de M. canis, mostrando que estas partículas virales son la causa de las alteraciones vistas en esta última cepa y confirmando la estrecha relación entre ellas; pudiéndose catalogar con certeza que M. canis dysgónico y cepa atípica de M. canis son cepas variantes de M. canis.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Ainsworth, G.C. (1971).
Dictionary of the Fungi.
Common Wealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal.
- 2.-Ajello Libero; Georg L.K.; Kaplan W; Kaufman L. (1973).
Laboratory Manual for Medical Micology.
U.S.A. Department of Health, Education, and Welfare.
Public Health Service.
Communicable Disease Center Atlanta 22, Georgia.
Pag. D-17, D-18.
- 3.-Mc Alser R. (1980).
Fungal Infections of the Scalp in Western Australia.
Sabouraudia;18:185-190.
- 4.-Allerd B.J. (1982).
Dermatophyte Prevalence in Wellington, New Zeland.
Sabouraudia;20:75-77.
- 5.-Alteras I. and Fuersman E.J. (1981).
Atypical Cases of M. canis Infection in Adult.
Mycopathologia;74:191-196.
- 6.-Banks G.T; Buck K.W; Chain E.B; Himmelweit F.; Marks J.E.;
Tyler J.M.; Hollings M.; Last F.T.; Stone O.M. (1968).
Viruses in Fungi an Interferon Stimulation.
Nature;128:542-545.
- 7.-Barnett H.L. and Hunter B.B. (1972).
Illustrated Genera of Imperfect Fungi.
Burgess Publishing Company.
3a. Ed. Pag. 112.
- 8.-Campell H.C. and Stewart J.L. (1980).
The Medical Publication John Wiley Ysons.
New York Circher Brisbane, Toronto.
Pag.45-6,94, 114-117,136-7,270, 288-291.
- 9.-Caprilli F.; Mercantini R.; Marsella G.; Farotti E. (1980).
Etiology of Ringworm of the Scalp, Beard and Body in Rome,
Italy.
Sabouraudia;18:129-135.
- 10.-Carter G.R.; Benke E.B.; Mc Allister H.A. (1970).
Ringworm of the Horses Cause by an Atypical form of
Microsporum canis.
J Amer Vet Med Ass;156:1048-1050.
- 11.-Cole G.T. (1981).
Biology of Conidial Fungi.
Vol. 2 Cap. 26. Viruses of Conidial Fungi.
Pag. 395-410.
Academic Press Inc. London.
- 12.-Chandler F.W.; Kaplan W.; Ajello L. (1980).
A Colour Atlas and Text Book of the Histopathology of
Mycocic Diseases.
Wolff Medical Publications Ltd.
Pag. 10,14,16,117,119,288,290-92.
- 13.-Dane J.; Padhye A.A.; Ajello L. (1982).
Microsporum equinum in North America.
J Clin Microbiol;16:943-947.

- 14.-Davis; Dulveco; Eisen; Ginsberg; Wood. (1968).
Tratado de Microbiología.
Salvat Editores, 2a. Ed.
Pag. 1023-1028. España.
- 15.-Dvoretzky I.; Semah D.; Sommer B.; Fisher B.K. (1978).
Microsporium canis Infection: First Epidemic in Israel.
Babouraudia, 16: 79/81.
- 16.-Emmons E.W.; Rinford Ch. H.; Uetz J.P. (1970).
Medical Mycology.
Lea Febiger.
Pag. 40, 131-2, 143.
2a. Ed.
- 17.-English M.P. (1978).
The dysgonic Strain of Microsporium canis.
Mycopathologia; 64: 73-81.
- 18.-English M.P.; Tucker D.L. (1978).
Atypical Strains of Microsporium canis.
Mycopathologia; 63: 113-120.
- 19.-English M.P.; Gentles J.C.; Ball E.H.. (1979).
Experimental Infection of Guinea-Pigs with Atypical and
dysgonic Strains of Microsporium canis.
Mycopathologia; 67: 179-181.
- 20.-Entestean L.; Kadman T.. (1982).
The Changing Clinical Picture of M. canis Infections in
Sweden.
Swe Acta Derm Venereol; 62: 539-541.
- 21.-Frey D.; Olfeld R.J.; Bridger R.C.. (1981).
A Colour Atlas of Pathogenic Fungi.
Wolfe Medical Publications.
Ltd. 2a. Reimpresion.
Pag. 22, 27, 29, 155.
- 22.-Funder B. (1968).
Practical Mycology.
Manual of Identification of Fungi.
Hafner Publishing Company, INC.
Pag. 18, 64, 93, 97.
3a. Ed.
- 23.-Gentles J. (1958).
The Successful Treatment of Ringworm by Systemic Means.
Proceedings of the Sixth International Congress on Tropical
Medicine and Malaria; IV: 5-13.
- 24.-Georgopoulos A.; Petranyi G.; Mieth H.; Drews. (1981).
In vitro Activity of Naftifine, a New Antifungal Agent.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 19: 386-389.
- 25.-Grigoriu D.; Delacretz J. (1982).
Mixed Dermatophytical Infection of the Scalp.
Dermatologia; 164: 407-409.
- 26.-Hasegawa A.; Usui K. (1974).
The Perfect State of Microsporium canis.
Jap J Vet Sci; 36: 447-449.
- 27.-Hasson A.B.A.Y.I.; El Doni M.A.; El Fasoly; Nohass M.F.
(1981).
Antimicrobial Activity of Some Alkaloidal Salts.
Mycose; 24: 421-430.

- 28.-Hazen E.L.; Morris A.; Gordon; Curtis R.F. (1970).
Laboratory Identification of Pathogenic Fungi Simplified.
Ed. Charles C. Thomas, Publisher.
3a. Ed. Pag. 26-28 U.S.A.
- 29.-Hollings M. (1962).
Viruses Associated with a Die-Bacil Disease of Cultivated
Mushroom.
Nature;196:962-965.
- 30.-Jang B.; Bieberstein E.; Barayss J.A. (1979).
Diagnóstico Microbiológico.
Departamento de Bacteriología y Micología de la Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.
Pag. 4, 58-9. Ed. UNAM, Mexico D.F..
- 31.-Kellenberger E.; Ryter A.; Sechand J. (1958).
Electron Microscope Study of DNA-Containing Plasmids.
The Journal of Biochemical Cytology;4:671-687.
- 32.-Kessel R.G.; Shieh C.V. (1976).
La Microscopia Electrónica de Barrido en Biología.
Ed. Dossart S.A.
Pag.1-8. 1a. Ed. Española. Madrid.
- 33.-Koleman; Fikret. (1981).
Dermatophytic Flora of Ankara (Turkey).
Dermatologia;162:260-264.
- 34.-Keon-Chung Joo; Bondar R.H.; Fethiere A.; Blank F. (1977).
Enigmatic Relationship of two Microsporium Species.
Sabouraudia;15:325-332.
- 35.-Lampson G.P.; Tytell A.A.; Field A.; Weiss M.H.; Hilleman
M.R. (1967).
Inducers of Interferon and Host Resistance. I.
Double-Stranded RNA from Extracts of Penicillium
funiculosum.
Biochemistry;50:782-789.
- 36.-Lueder I.M.; O'Sullivan J.G. (1958).
Ringworm in Cattle.
Prevention and Treatment with Griseofulvin.
The Veterinary Record;70:949-951.
- 37.-Mac Faddin. (1982).
Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de
Importancia Clínica.
Ed. Panamericana.
Pag.27,32.
- 38.-Martin P.A.; Vazquez R. (1979).
Dermatofitos (Aspectos Clínicos y Morfología
Ultraestructural).
Ed. Universidad de Salamanca.
Pag. 59-63, 118-133, 239-247.
- 39.-Meingassner J.G.; Sleytr U.; Patranyi. (1981).
Morphological Changes Induced by Nattifine, a new
Antifungal Agent, in Trichopyton mentagrophytes.
Journal of Investigative Dermatology;77:444-451.
- 39.-Meingassner J.G.; Sleytr V.B. (1982).
The Effects of Nattifine on the Ultrastructure of
Candida parapsilosis; a Freeze-Fracture Study.
Sabouraudia;20:199-207.

- 41.-Mercer E.H.; Bribeck M.B.C. (1972).
Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos.
H.Blume Ediciones.
Pag.1-44, 58, 91. Madrid.
- 42.-Midgley Oillian. (1981).
A glabrous Microsporum canis in Greater London.
Sabouraudia;19:71-77.
- 43.-Miyazaki H.; Seiji M.; Takagi Y. (1966).
Electron Microscopic Study on fungi in Horny Layer.
The Journal of Dermatology;76:265-271.
- 44.-Onsberg P.; Sylvest B. (1981).
Microsporum canis Infections of the Scalp in Adult in
Denmark.
Mykosen;24:275-277.
- 45.-Petranyi G.; Georgopoulos A.; Mieth H. (1981).
In Vitro Antimycotic Activity of Naftifine.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy;19:390-392.
- 46.-Raubitschok F. (1961).
Mechanical Versus Chemical Keratolysis by Dermatophytes.
Sabouraudia;11:87-90.
- 47.-Rebell G.; Taplin D. (1964).
Dermatophytes: Their Recognition and Identification.
University of Miami.
Pag. 13-14.
- 48.-Reynolds E.B. (1963).
The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron Opaque
Strain in Electron Microscopy.
Journal of Cell Biology;17:208-212.
- 49.-Roth F.J.; Ballman B.; Blank H. (1959).
In Vitro Studies of the Antifungal Antibiotic Griseofulvin.
The Journal of Investigative Dermatology;33:403-418.
- 50.-Sabouraud D.R. (1910).
Les Teignes.
Masson Et Cie, Paris.
Pag. 226, 246..
- 51.-Saruta T.; Sato K. (1980).
Rice Grain Slide Culture for Identification of Microsporum
canis (Japan).
Dermatology;42:990-991.
- 52.-Sinski J.; Katherine F. (1984).
A Survey of Dermatophytes Isolated from Human Patients in
the United States from 1979 to 1981 with Chronological
Listings of Mold Wide Incidence of Five Dermatophytes Often
Isolated in the United States.
Mycopathologia;85:97-120.
- 53.-Steiner P.M. (1975).
The Extraction and Characterization of Bovine Epidermal
 α -Keratin.
Biochemical Journal;149:39-48.
- 54.-Swenson F.J.; Wrich J.A. (1980).
Fatty Acids of Dermatophytes.
Sabouraudia;18:1-9.

- 55.-Takiuchi I.; Higuchi D. (1977).
Isolation, Purification and Biochemical Properties of
Keratinase Elaborated from Microsporum gypseum.
The Japanese Journal of Dermatology;187:305-309.
- 56.-Takiuchi I.; Higuchi D.; Sei Y.; Koga M. (1982).
Isolation of an Extracellular Proteins (Keratinase) from M.
canis.
Sabouraudia;20:281-288.
- 57.-Takiuchi I.; Sei Y.; Takagi H.; Negi M. (1984).
Partial Characterization of the Extracellular Keratinase
from Microsporum canis.
Sabouraudia;22:219-224.
- 58.-Taylor R.Y.; Cadigan F.C.; Chiscumpa V. (1973).
Infections Among that Oribbons and Human Caused by Atypical
Microsporum canis.
Lab Animal Sci;23:226-231.
- 59.-Tomomatsu B. (1960).
A Study on Griseofulvin I. Comparison of Electron
Microscopical Observation of Effect of Griseofulvin with
that of Fungicidal Drug.
Bulletin of Pharmaceutical Research;26:11-20.
- 60.-Velasco Castrejon O.; Tay Zavala J. (1970).
Micología para Estudiantes de Medicina.
Editado por la UNAM.
Pag.28-38.
- 61.-Velasco J.A.; Martín-Pascual A.; Pérez García A. (1979).
Epidemiologic Study of Dermatophytoses in Salamanca
(Spain).
Sabouraudia;17:113-123.
- 62.-Walker J. (1950).
Variation in Microsporum canis and Microsporum audouinii.
British Journal of Dermatology;62:395-401.
- 63.-Zapater R.C. (1970).
Introducción a la Micología Médica.
2a. Ed. Buenos Aires.
Librería el Buen Ateneo.
Pag. 51-52.