

148
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

USO DE LAMINILLAS SILICONADAS
COMO UN NUEVO METODO DE
MICROCULTIVO PARA EL ESTUDIO
MORFOLOGICO Y DETERMINATIVA
DE DERMATOFITOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
GRACIELA MORENO MALDONADO

MEXICO, D. F.

MAYO 1992

TESIS CON
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.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.	1 - 5
JUSTIFICACIÓN.	
ANTECEDENTES.	
GENERALIDADES DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE DERMATOFITOS.	6 - 13
OBJETIVOS.	14
HIPÓTESIS DE TRABAJO.	15
MATERIAL Y MÉTODOS.	16 - 22
RESULTADOS.	23 - 26
DISCUSIÓN.	27 - 31
CONCLUSIONES.	32
APÉNDICE I	33 - 40
REFERENCIAS.	41 - 44

INTRODUCCION.

La investigación llevada a cabo en los últimos años ha incrementado notablemente el conocimiento de las enfermedades causadas por hongos que afectan al hombre, siendo las infecciones de la piel las más frecuentes, tanto que se comparan en su frecuencia y distribución con las enfermedades causadas por virus y bacterias. (Emerson, 1952).

Los dermatofitos constituyen un grupo de hongos filamentosos que parasitan al hombre y algunos animales. Emmons, 1934. Afectan la capa córnea de la piel y sus anexos, queratinizados (pelo y uñas), ocasionalmente invaden las capas más profundas de la piel causando lesiones granulomatosas, conocidas como granuloma de Majocchi. (Emmons, 1934; Segretain, 1966).

Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones por dermatofitos se clasifican en tres grupos, infecciones por dermatofitos geofílicos, es decir adquiridos directamente del suelo, donde existe el hongo como saprófito; infecciones por dermatofitos zoofílicos, que generalmente se contraen directamente de animales infectados; e infecciones por dermatofitos antropofílicos, los que son transmitidos de humano a humano y comúnmente no infectan animales. (González, 1974).

Clinicamente la agrupación se hace en base a la topografía, que comprende la afección del pelo, uñas, barba, y piel, comprendidas bajo la denominación de tinea capitis, tinea unguium, tinea barbae y tinea glabra, respectivamente, esta última a su vez se subdivide en tinea pedis, tinea manus, tinea cruris, y tinea corporis cuando afecta los pies, manos e ingle, o cualquier otra región anatómica del cuerpo (Conant, 1973).

Desde el punto de vista micológico; Emmons, 1934, agrupa a los dermatofitos en tres géneros, Trichophyton, Microsporum, y Epidermophyton, siendo hasta el momento la más aceptada.

Con respecto al estudio de las dermatofitosis en nuestro país, la aportación más importante o al menos la más completa ha sido la de González Ochoa, (1941, 1945, 1947, 1955, 1957, 1966, y 1974), cuyos estudios enfocados a la determinativa, taxonomía y tratamiento de este grupo de hongos, así como a la incidencia, distribución variación y predominio de las diferentes especies de dermatofitos influenciados por diversos factores tales como, regiones geográficas, cambios en la ecología, migración de las poblaciones, higiene y medidas terapéuticas.

El diagnóstico micológico de los dermatofitos consiste en el cultivo y examen microscópico de las escamas de las regiones afectadas (piel, uñas y pelo). El cultivo también tiene gran importancia en la taxonomía y epidemiología de las diferentes especies de dermatofitos.

La identificación micológica de los cultivos comprende los aspectos macroscópicos de la colonia; color, consistencia, producción de pigmento y finalmente el estudio de la morfología microscópica, (Rippon, 1990).

La morfología macroscópica de los hongos se aprecia mejor en cultivos efectuados en cajas de Petri, más que en tubo, sin embargo, hay un riesgo mayor de diseminar conidios e hifas fragmentadas (artroconidios) que son transportados por el aire como en el caso de los cultivos de Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum y N. asteroides, entre otras; así mismo cuando se trabaja con hongos no patógenos, existe igual riesgo al manipular las cajas de diseminar conidios en el laboratorio y causar contaminaciones fastidiosas.

Para el estudio de la morfología microscópica de los hongos se recurre a las preparaciones directas o preparaciones en fresco, las que consisten en colocar una pequeña porción de la colonia, cerca del centro, en una gota de KOH al 10 -20% o en azul de algodón lactofenol.

Se dilacera con agujas de disección, se coloca un cubreobjetos y se observa al microscópio.

Recientemente, Endo, 1966; propone un nuevo método práctico que conserva intactas las estructuras de reproducción de los hongos, mejorando las preparaciones en fresco. Se ha logrado también, mediante los llamados cultivos en lámina o microcultivos, conservar intacta las estructuras características, tanto de reproducción como las del micelio.

Así mismo se pueden obtener preparaciones permanentes, teñidas con diversas técnicas, lo que permite un estudio más detallado de la morfología microscópica de los hongos.

Las técnicas desarrolladas tienen inherentes ventajas y desventajas, como las descritas por Henricis, 1951, Rivalier 1954, Riddell, 1950.

Un cambio radical en las técnicas de cultivo en lámina o microcultivo, fué introducido por Higashi y colaboradores, 1962 quienes emplearon laminillas tratadas con dimetil-silicon, para el cultivo de bacilo tuberculoso, obteniendo resultados altamente satisfactorios. Shibayama en 1972, ensayó este procedimiento tratando de obtener microcultivos de Nocardiae, grupo taxonómicamente relacionando con Mycobacteriae, con resultados igualmente satisfactorios.

Con base en estos hallazgos, ha sido el propósito ensayar este método para el estudio de los dermatofitos fundamentalmente, en lo concerniente a la fijación en la laminilla de todas las estructuras de reproducción y del micelio, cuyas características permiten hacer la identificación de este grupo de hongos. Para establecer la bondad de este método, se hicieron paralelamente los estudios, empleando a nuestro juicio uno de los mejores métodos de microcultivo como lo es la técnica de Riddell, (1950).

GENERALIDADES DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE DERMATOFITOS.

El grupo de hongos causantes de las dermatofitosis presentan una morfología parasitaria muy sencilla que se reduce a dos aspectos únicamente: hifas septadas simples o ramificadas y conidios. (Zapater, 1958).

El diagnóstico micológico se efectúa mediante el examen microscópico de las escamas de piel, uñas, pelo y en algunas ocasiones exudados como en el caso del granuloma de Majocchi, (Zapater, 1958).

En los cultivo se desarrollan colonias cuya imagen microscópica exhibe micelio macrosifonado, septado, con dos elementos celulares de reproducción, unas células pequeñas, de forma piriforme o esférica denominadas "microconidios", aproximadamente 2 a 5 micrómetros, que se disponen en el trayecto de las hifas, ya sea directamente o sostenidas por una pequeña base; y otras células grandes septadas denominadas " macroconidios" 4-8,8 X 50 micrómetros

Las características morfológicas de ambos elementos, así como su ausencia o presencia han determinado el reconocimiento de tres géneros en los dermatofitos (Emmons, 1934), con las siguientes características de las especies más frecuentes en México. (González-Ochoa y col 1974).

Género Trichophyton. Se caracteriza este género por sus macroconidios claviformes de 4-8 X 8-50 micrómetros con paredes lisas, de unos 2 micrómetros de diámetro, unicelulares o hasta con cuatro septos. Los microconidios son esféricas o claviformes (Esquema 1). La forma sexuada (Ascomicetos) se incluye en el género Arthroderma que se distingue por una protuberancia nudosa que se forma en la parte terminal de las hifas peridiales.

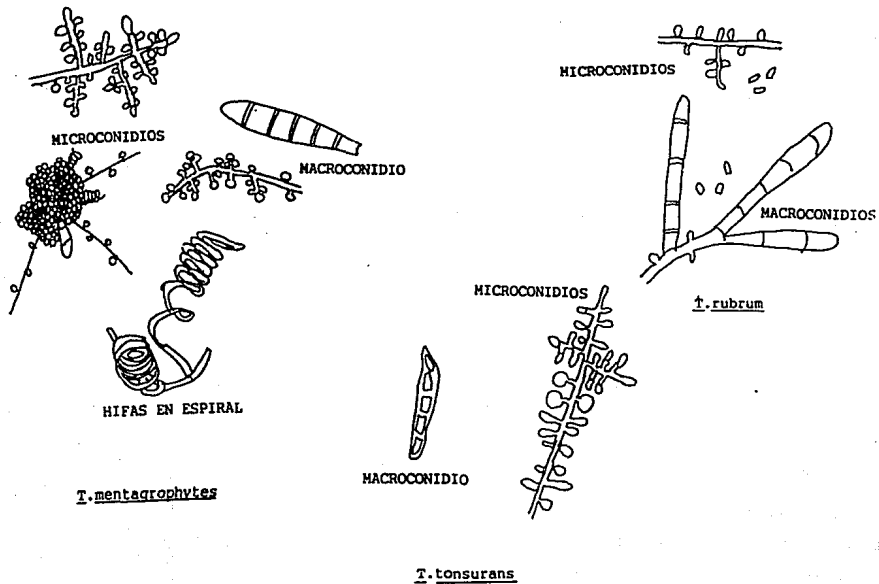
T. mentagrophytes. Es un agente productor de tiñas de la piel y de la uñas. Esta especie es la causante del conocido "pie de atleta", y con frecuencia origina la "tinea barbae". La infección se contrae de fuentes humanas y animales.

CULTIVO.

T. mentagrophytes.

a) Características macroscópicas: Las colonias se desarrollan rápidamente exhibiendo un aspecto granuloso o algodonoso.

ESQUEMA 1 MORFOLOGIA MICROSCOPICA DE LAS ESPECIES MAS FRECUENTES EN
MEXICO DEL GENERO *Trichophyton*.



b) Características microscópica: Presenta microconidios esféricos de 2 a 5 micrómetros de diámetro, dispuestos lateralmente en el trayecto de las hifas. Los macroconidios son claviformes, sostenidos por un corto pedículo, tabicados, de un tamaño que varía entre 15 a 50 micrómetros. En algunos aislamientos se pueden formar espirales y cuerpos nodulares.

T. rubrum. Es uno de los agentes de tifias más común y al mismo tiempo más rebelde de combatir.

CULTIVO.

T. rubrum.

a) Características macroscópicas: Forma colonias blancas algodonosas o aterciopeladas a veces ligeramente pulverulentas. El reverso suele exhibir un color rojo-purpura.

b) Características microscópicas: Abundantes microconidios piriformes (2,5 X 3-5 micrómetros) insertados en el trayecto de las hifas. Los macroconidios son escasos de forma cilíndrica con los extremos redondeados y presencia de septos transversales entre tres y ocho (4-6 X 15-30 micrómetros). Existen numerosas hifas en raqueta y clamidosporas.

T. tonsurans. Es una especie cosmopolita de tinea capitis. Clínicamente se destaca la fragilidad de los pelos, que se rompen dejando cortos fragmentos oscuros que resaltan de las partes alopécicas escamosas. Esta especie también puede afectar la piel y las uñas. La infección se contrae de fuentes humanas.

CULTIVO:

T. tonsurans

a) Características macroscópicas: Se desarrolla con facilidad, aunque lentamente, en el medio glucosado de Sabouraud y a la temperatura ambiente, la colonia se hace aparente entre el tercero y quinto día, y se la puede identificar aproximadamente a los 12 días. Esta especie exhibe toda una gama de variaciones, al inicio forma una pequeña colonia blanca aterciopelada que se va tornando amarillenta ó de un color azufrado y ligeramente pulverulenta.

b) Características microscópicas: Los microconidios son piriformes, hialinos y pequeños (3,6 X 1,5 micrómetros). Cuando el cultivo envejece, los microconidios se hacen más grandes e irregulares y aparecen una gran cantidad de clamidoconidios.

Los macroconidios son muy escasos e irregulares, tanto en forma como en tamaño. La mayoría presentan de 3 a 4 células (28 X 10 micrómetros). Las más largas llegan hasta los 80 micrómetros con 9 células.

Género Microsporium. Se caracteriza por poseer macroconidios de superficie rugosa, forma elipsoidal fusiforme u oval con presencia de varios septos transversales. Los microconidios son de aspecto claviforme y pueden ser sésiles o disponerse sobre cortos filamentos. También pueden formarse hifas en raqueta, cuerpos nodulares y clamidoconidios. (Esquema 2).

M. canis. Es el agente más común de tifa microspórica. La infección proviene generalmente de animales domésticos (gatos, perros y caballos). La propagación es posteriormente interhumana.

CULTIVO:

M. canis.

a) Características macroscópicas: En el medio de Sabouraud, la colonia está formada por un micelio aéreo lanoso o algodonoso, de rápido crecimiento, blanco al principio pero que al poco tiempo se vuelve amarillento. Este pigmento amarillo se difunde a través del medio y se produce con más frecuencia en Agar Papa Dextrosa.

b) Características microscópicas: Se caracteriza por sus macroconidios alargados y fusiformes (75 micrómetros de promedio), de base truncada y con sus extremos en punta "forma navicular". Poseen una pared gruesa verrucosa y generalmente presenta entre 6 y 12 septos. Los microconidios son escasos y piriformes (2,5-3,5 X 4 a 7 micrómetros). También se observan hifas en raqueta, pectinadas, cuerpos nodulares y clamidosporas.

M. gypseum. Se encuentra comúnmente en el suelo. Es un parásito frecuente en los animales, más raro en el hombre. Es cosmopolita, produce lesiones inflamatorias tanto en la piel lampiña como en la cabelluda. En esta última localización se muestra con el aspecto de un favus, (tíña que forma costra amarilla).

a) Características macroscópicas: Exhibe colonias de crecimiento rápido, aplanadas, de bordes irregulares, al principio son lanosa pero luego se torna pulverulenta. Se caracterizan por su color castaño canela.

b) Características microscópicas: Está constituida por numerosos macroconidios, elipsoidales, de paredes delgadas, rugosas o equinuladas, multiseptados con 4 a 6 tabiques de un tamaño que varía entre (25 a 60 X 7,5 a 16 micrómetros). Los microconidios son muy escasos, sésiles y claviformes, de (2,5 a 3 X 4-6 micrómetros). Hay también hifas en raqueta y cuerpos pectinados y nodulares.

Género Epidermophyton. Comprende una sólo especie y no se ha encontrado la forma perfecta. (Esquema 2).

El Epidermophyton floccosum ataca exclusivamente la piel glabra y las uñas . Es una especie antropofílica.

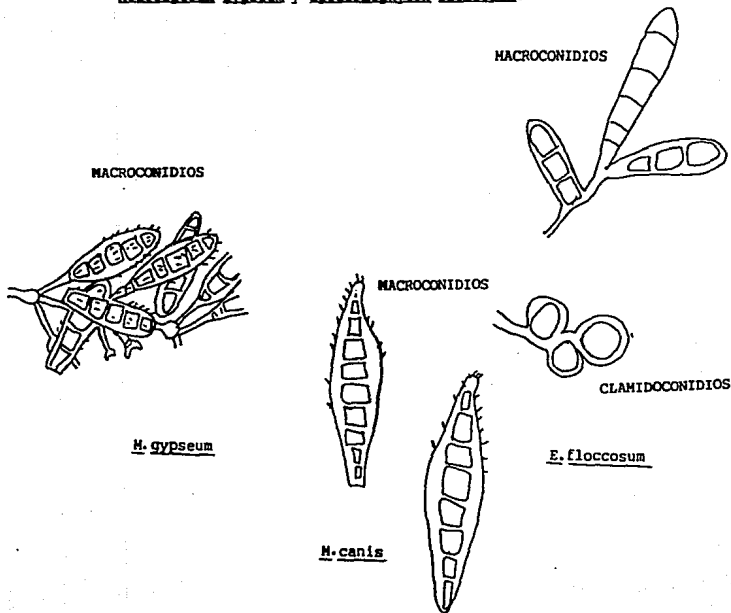
CULTIVO.

E. floccosum.

a) Características macroscópicas: En el medio glucosado de Sabouraud, forma colonias blanco-amarillentas, pulverulentas, con numerosos pliegues radiados. Es de crecimiento lento.

b) Características microscópicas: Abundantes macroconidios septados con (dos a cuatro septos), claviformes, con uno de sus extremos bien redondeados y paredes lisas y gruesas. Los macroconidios pueden observarse sólo o se encuentran agrupados en racimos. No produce microconidios.

ESQUEMA 2 MORFOLOGIA MICROSCOPICA DE: Microsporium canis,
Microsporium gypseum y Epidermophyton floccosum.



OBJETIVOS

I.- El propósito fundamental de este trabajo es el de estudiar las posibilidades de aplicación de las laminillas siliconadas, como una técnica de microcultivo que ofrezca ventajas sobre los métodos clásicos para microcultivos utilizados en Micología.

II.- Obtener una imagen clara de los hongos, posibilitando así el estudio comparativo entre las especies de un mismo género.

III.- Estudiar los cambios morfológicos microscópicos que presentan los dermatofitos durante su desarrollo, utilizando laminillas siliconadas, y paralelamente el método de Riddell.

IV.- Encontrar el medio de cultivo más adecuado para la esporulación y características del micelio de los dermatofitos utilizando laminillas siliconadas.

HIPOTESIS DE TRABAJO

I.- Se espera que los dermatofitos se desarrollen sobre la laminilla siliconada, y que durante su coloración no se desprenda el crecimiento y se puedan obtener preparaciones fijas confiables.

II.- Los dermatofitos exhibirán diferentes comportamientos en la esporulación debido al empleo de diferentes medios de cultivo.

III.- La esporulación de los dermatofitos se verá afectada por la concentración de oxígeno en el método de microcultivo en laminillas siliconadas ya que no es uniforme.

IV.- Se espera encontrar un comportamiento similar en los elementos de reproducción de los dermatofitos, tanto en las laminillas siliconadas como en la técnica de Riddell.

MATERIAL Y METODOS

El estudio comprende un total de 11 cepas de referencia: 9 cepas de dermatofitos y 2 cepas del género Nocardia, procedentes del Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, de la Secretaría de Salud. (Tabla 1).

METODO DE LAMINILLAS SILICONADAS

Se siguió el método descrito por Higashi y colaboradores, 1962, con algunas modificaciones, para simplificar el tratamiento y uso de cantidades grandes de laminillas

A) OBTENCION DE LAMINILLAS:

1) Portaobjetos de vidrio ordinario fueron cortados longitudinalmente en 3 partes, de tal manera que midan aproximadamente 9 X 75 mm.

Tabla 1 .RELACION DE CEPAS ESTUDIADAS CON DETERMINATIVA Y NUMERO DE REGISTRO DE LA COLECCION DEL (INDRE).

GENERO	ESPECIE	NUMERO DE REGISTRO
<u>Trichophyton</u>	<u>rubrum</u>	7010
<u>Trichophyton</u>	<u>rubrum</u>	7001
<u>Trichophyton</u>	<u>mentagrophytes</u>	7111
<u>Trichophyton</u>	<u>mentagrophytes</u>	7109
<u>Trichophyton</u>	<u>mentagrophytes</u>	7104
<u>Trichophyton</u>	<u>tonsurans</u>	7203
<u>Microsporum</u>	<u>canis</u>	7307
<u>Microsporum</u>	<u>gypseum</u>	7400
<u>Epidermophyton</u>	<u>floccosum</u>	S/N
<u>Nocardia</u>	<u>asteroides</u>	2640
<u>Nocardia</u>	<u>brasiliensis</u>	4267

S/N Sin Registro.

2) Se lavan escrupulosamente para eliminar cualquier película de grasa en la superficie, de la siguiente manera.

a) Se colocan en un vaso de precipitado y se dejan toda la noche en mezcla crómica.

b) Para eliminar la mezcla crómica, se colocan las laminillas en el chorro de agua de la llave agitando y vertiendo varias veces, finalmente se enjuagan con agua destilada.

c) Se escurren y se ponen en la estufa a secar, dejando el vaso invertido para acelerar el secado.

d) Cuando están perfectamente secos se sumergen en una solución al 2% (v/v) de Dimetil silicon (Dow. "DC-200 fluid" 350 centistokes) en tetracloruro de carbono, durante 15 minutos.

e) Escurrir y dejar que el solvente se evapore, a temperatura ambiente.

f) Finalmente cuando el solvente se ha eliminado, las laminillas en el vaso de precipitado, se invierten y se dejan en el horno durante una hora a una temperatura de 300°C, para estabilizar el silicon.

g) Las laminillas siliconadas, se manejan solo con pinzas para evitar que se engrasen. Si el procedimiento fue correctamente aplicado, las laminillas ya tratadas al sumergirlas en agua deben quedar completamente secas, sin gotas de agua adheridas, esto es, totalmente repelentes al agua.

B) MICROCULTIVO

1) En tubos de ensaye de 15 X 150 mm, se envasan 8 ml de medio de cultivo.

2) Se coloca una laminilla previamente siliconada en el tubo y se tapa con tapón de algodón.

3) Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

4) Se siembra con pequeñas porciones de micelio de las diferentes cepas y se incuba el microcultivo a temperatura de laboratorio, (20 a 25°C). Figura 1

FIGURA 1 PREPARACION DEL MICROCULTIVO CON LAMINILLA SILICONADA

TUBO DE ENSAYE



LAMINILLA SILICONADA

TAPON DE ALGODON



INOCULO

MEDIO DE CULTIVO

El tiempo de incubación para los cultivos en laminillas siliconadas fué de, 5, 10 y 15 días, dándose estos tiempos arbitrariamente, dejándose desarrollar estos a temperatura ambiente, realizando posteriormente las observaciones microscópicas de la morfología y las estructuras de los diferentes hongos y actinomicetes.

Los microcultivos en las laminillas siliconadas fueron previamente fijados con formol al 5% durante 10 minutos y coloreados con la técnica de Schiff, (Matthem, J.L. 1972, TMS-227-8, 1964), para los cultivos de los dermatofitos, y con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada para tefir los microcultivos de Nocardia (Rippon, 1990).

TECNICA DE RIDDELL

- 1) Colocar una varilla de vidrio doblada en forma de V, dentro de una caja de Petri de 15 X 90 mm.
- 2) Poner un portaobjetos sobre la varilla de vidrio.
- 3) Esterilizar el material en el horno durante 90 minutos a una temperatura de 161°C.
- 4) Vaciar alrededor de 15 ml del medio de agar fundido en una caja de Petri estéril.
- 5) Una vez solidificado el medio se cortan con bisturi cuadros de 1 cm cuadrado que tendrán un espesor de 2 mm, aproximadamente.
- 6) Colocar un cuadro de medio de cultivo, de 1 cm cuadrado sobre el portaobjetos.
- 7) Sembrar los cuatro lados del bloque de agar con fragmentos de micelio.

8) Colocar un cubreobjetos centralmente sobre el bloque de agar.

9) Poner mas o menos 7-8 ml de agua glicerinada al 10% estéril.

10) Cuando la esporulación ha ocurrido, sin ser excesiva, se quita el cubreobjetos y se monta en un nuevo portaobjetos con azul de algodón, se sella con barniz de uñas.

11) Se desecha el cuadro de gelosa.

12) El crecimiento en el portaobjetos se tife por la técnica de Schiff y se monta con resina o bálsamo de Canada.

13) Se realizan las observaciones al microscópio.

(Figura 2).

El tiempo de incubación para el estudio de los microcultivos con el método de Riddell fué de 4 y 8 días, dandose estos tiempos arbitrariamente, el desarrollo obtenido en el cubreobjetos fue teñido con azul de algodón lacto fenol, se montó en portaobjetos nuevos, y se selló con barniz para uñas, constituyendo una preparación semipermanente.

FIGURA 2 TECNICA DE RIDDELL



1



5



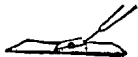
6



7



8



10



11



12

En cuanto al desarrollo en el portobjetos fué fijado con alcohol y luego coloreado con la técnica de Schiff, y montado con resina sintética obteniéndose una preparación permanente.

Los medios de cultivo utilizados en este estudio con ambos métodos de microcultivo fueron, agar glucosado de Sabouraud (AGS), agar papa dextrosa (APD), y agar papa zanahoria (APZ), omitiéndose el agar para los cultivos en láminas siliconadas.

Las técnicas de coloración, preparación de colorantes, y la composición y preparación de los medios de cultivo están contenidos en el Apendice I.

RESULTADOS.

I.- MORFOLOGIA COLONIAL

Las peculiaridades morfológicas de la colonia gigante de las nueve cepas de dermatofitos estudiados, mostraron en general, las características descritas en la literatura para este grupo de hongos, (Tabla 2); sin embargo, la producción de pigmento por las cepas de T. rubrum, sólo se observó en los medios de agar papa dextrosa y agar papa zanahoria.

II.- MICROCULTIVOS

Las revisiones microscópicas a los cuatro días de incubación por la técnica de Riddell mostraron buen crecimiento, revelando diferentes estructuras del micelio, tales como, hifas pectinadas, hifas en espiral, cuerpos nodulares, clamidosporas, y estructuras de reproducción, su distribución y disposición in situ, característicos de cada una de las cepas estudiadas (Tabla 3) dandose esporulación en las cepas de T. mentagrophytes, T. tonsurans, M. gypseum y M. canis, ésta última con macroconidios inmaduros.

Tabla 2 CARATERIASTICAS MORFOLOGICAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE DERMATOFITOS EN MEDIO AGAR SABOURAUD DEXTROSA

ESPECIE	BORDE	PIGMENTO AL REVERSO DE LA COLONIA	ELEVACION	TEXTURA	CRECIMIENTO
<u>T rubrum</u>	irregulares	ausente	plana	vellosa pulverulento	lento
<u>T mentagrophytes</u>	irregulares.	cafe amarillo	plana	granular algodonosa	rapido
<u>T tonsurans</u>	plegado	blanca amarillenta	deprimida	algodonosa	rapido
<u>M canis</u>	plana	amarillo canario	plana	algodonosa	rapido
<u>M gypseum</u>	irregulares	canela	plana	algodonosa	rapido
<u>E floccosum</u>	saliente	amarillento	umbrinocada	algodonosa	lento

Tabla 3 MICROCULTIVO; TECNICA DE RIDDELL, 4 DIAS DE DESARROLLO.
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

CEPAS	MICRO- CONIDIOS			MACRO- CONIDIOS			HIFAS PECTINADAS			HIFAS EN ESPIRAL			CUERPOS MODULARES			CLAMIDOSPO- RAS		
	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ
<u>T rubrum</u> 7818	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T rubrum</u> 7881	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T menta- grophytes</u> 7111	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T menta- grophytes</u> 7189	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>T menta- grophytes</u> 7184	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>T tonsu- rans</u> 7283	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>M canis</u> 7387	-	-	-	-	INMADU RAS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M gypseum</u> 7488	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>E flocco- sum</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No esporulo
+ poca esporulacion
++ esporulacion abundante
+++ esporulacion muy abundante

No esporularon las 2 cepas de *T. rubrum* y la de *E. floccosum*, en los tres medios de cultivo empleados.

A los ocho días de incubación, los microcultivos revelaron crecimiento abundante con las características del micelio observados a los cuatro días de desarrollo. Las estructuras de reproducción (microconidios y macroconidios) fueron observados en mayor cantidad en los medios de agar papa dextrosa y agar papa zanahoria, sin embargo, las cepas de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, y *T. tonsurans*, que formaron abundantes microconidios, no formaron macroconidios en los diferentes medios de cultivo empleados, (Tabla 4).

Los microcultivos en laminillas siliconadas de los dermatofitos mostraron buen desarrollo a los 5 días de incubación, incrementándose notablemente a los diez y quince días de su desarrollo. El crecimiento fué denso y firmemente adherido en ambos lados de la laminilla siliconada, sobre todo en la parte que queda cerca de la superficie del medio líquido, en donde la tensión de oxígeno es mayor, disminuyendo hacia el extremo opuesto. La distribución del crecimiento fué más o menos uniforme, denso en la parte más oxigenada y con microcolonias aisladas hacia el fondo del medio líquido. Fotos 1,2,3.

Tabla 4 MICRO CULTIVO: TÉCNICA DE RIDDELL, 8 DIAS DE DESARROLLO.
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

CEPAS	MICRO- CONIDIOS			MACRO- CONIDIOS			HIFAS PECTINADAS			HIFAS EN ESPIRAL			CUERPOS MODULARES			CLAMIDOSPO RAS		
	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ	AGS	APD	APZ
<u>I rubrum</u> 7010	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I rubrum</u> 7001	++	+	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta- graphytes</u> 7111	++	+++	+++	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta- graphytes</u> 7109	++	+++	+++	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta- graphytes</u> 7104	++	+++	+++	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>I tonsu- rans</u> 7203	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>M canis</u> 7307	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M gypsum</u> 7400	++	-	-	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>E flocco sum</u>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

- No esporulo
+ poca esporulacion
++ esporulacion abundante
+++ esporulacion muy abundante



FOTO 4 M. gypsum. MACROCONIDIOS, ELIPSOIDALES, DE PAREDES DELGADAS RUGOSAS, MULTISEPTADOS. 480X

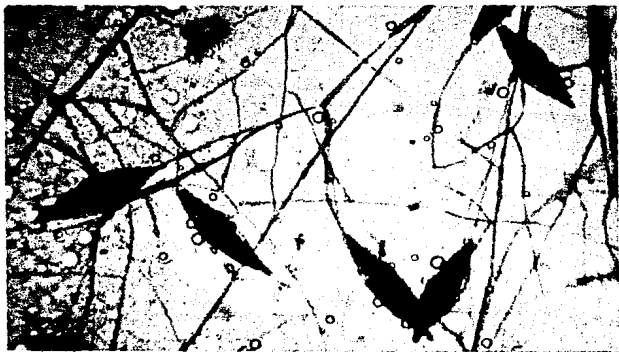


FOTO 5 M.canis. MACROCONIDIOS ALARGADOS Y FUSIFORMES, DE BASE TRUNCADA, CON SUS EXTREMOS EN PUNTA. "FORMA NAVICULAR". PAREDES GRUESAS Y VERRUCOSOS. 480X



FOTO 6 E. floccosum. MACROCONIDIOS SEPTADOS, CLAVIFORMES CON UNO DE SUS EXTREMOS BIEN REDONDEADOS Y PAREDES LISAS Y GRUESAS. 480X



FOTO 7 T. rubrum. ABUNDANTES MICROCONIDIOS PIRIFORMES, INSERTADOS EN EL TRAYECTO DE LAS HIFAS. 160X

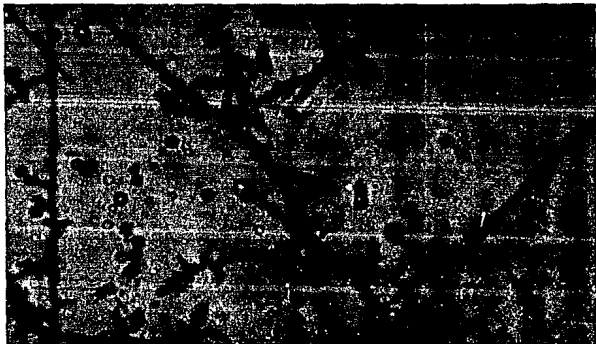


FOTO 8 T. mentagrophytes. MICROCONIDIOS ESFERICOS, DISPUESTOS LATERALMENTE EN EL TRAYECTO DE LAS HIFAS. 160X



FOTO 9 T. Konsumans. MICROCONIDIOS PIRIFORMES, HIALINOS Y PEQUEÑOS, DISPUESTOS LATERALMENTE EN EL TRAYECTO DE LAS HIFAS. 160X

Los resultados se indican en las Tablas 5,6,7.

Los microcultivos de N. brasiliensis y N. asteroides, desarrollaron desde los 5 días de incubación, siendo el crecimiento más abundante en la parte de la laminilla que queda cerca de la superficie del medio. Las laminillas despues de inactivación en formol al 5% y teñidas con la técnica de Zielh-Neelsen, reveló la presencia de micelio microsifonado, ramificado y con fragmentación en elementos bacilares y cocoides, parcial pero inténsamente ácido resistentes, (Foto 10,11).

Tabla 5 MICROCULTIVO: TECNICA DE LAMINILLAS SILICONADAS, 5 DIAS DE DESARROLLO. DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

CEPAS	MICRO- CONIDIOS			MACRO- CONIDIOS			HIFAS PECTINADAS			HIFAS EN ESPIRAL			CUERPOS MODULARES			CLAMIDOSPO RAS		
	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ
<u>I rubrum</u> 7010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I rubrum</u> 7001	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta- grophytes</u> 7111	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta- grophytes</u> 7109	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta- grophytes</u> 7104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I tonsu- rans</u> 7203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M canis</u> 7307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M gypsum</u> 7400	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>E flocco- sum</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No esporulo
 + poca esporulacion
 ++ esporulacion abundante
 +++ esporulacion muy abundante

Tabla 6 MICROCULTIVO: TECNICA DE LAMINILLAS SILICONADAS. 10 DIAS DE DESARROLLO. DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

CEPAS	MICRO-CONIDIOS			MACRO-CONIDIOS			HIFAS PECTINADAS			HIFAS EN ESPIRAL			CUERPOS NODULARES			CLAMIDOSPORAS		
	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ
<u>I rubrum</u> 7010	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I rubrum</u> 7001	++	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta-grophytes</u> 7111	++	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta-grophytes</u> 7109	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>I menta-grophytes</u> 7104	++	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<u>I tonsurans</u> 7203	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<u>M canis</u> 7307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M gypseum</u> 7400	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>E flooco sum</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No esporulo
 + poca esporulacion
 ++ esporulacion abundante
 +++ esporulacion muy abundante

Tabla 7 MICROCULTIVO: TECNICA DE LAMINILLAS SILICONADAS, 15 DIAS DE DESARROLLO. DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

CEPAS	MICRO-CONIDIOS			MACRO-CONIDIOS			HIFAS PECTINADAS			HIFAS EN ESPIRAL			CUERPOS NODULARES			CLAMIDOSPORAS		
	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ	CGS	CPD	CPZ
<u>T rubrum</u> 7818	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<u>T rubrum</u> 7881	++	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T menta-</u> <u>grophytes</u> 7111	++	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T menta-</u> <u>grophytes</u> 7109	++	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T menta-</u> <u>grophytes</u> 7104	++	+++	+++	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>T tonsu-</u> <u>rans</u> 7283	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<u>M canis</u> 7387	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>M gypseum</u> 7488	-	+	+	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>E flocco-</u> <u>sum</u>	-	-	-	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- No esporulo
 + poca esporulacion
 ++ esporulacion abundante
 +++ esporulacion muy abundante



FOTO 10 LAMINILLAS SILICONADAS.
DESARROLLO DE MICROCULTIVOS DE N.asteroides Y
N.brasiliensis.
EMPLEANDO DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO (CSD,CPD Y CPZ)

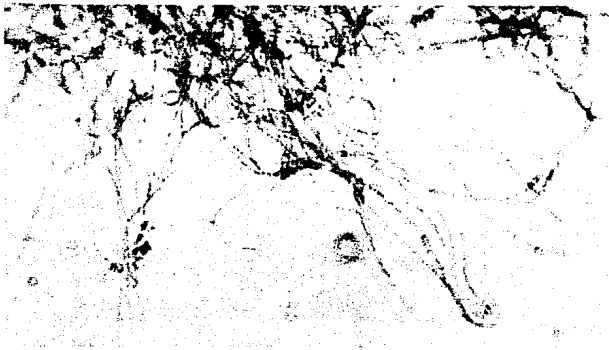


FOTO 11 N. brasiliensis. ELEMENTOS FRAGMENTADOS EN
ESTRUCTURAS BASILARES, MICROSIFONADAS. 480X

DISCUSION.

La identificación de los hongos en general y de los dermatofitos en particular, depende más de las características morfológicas, que de las características fisiológicas, bioquímicas y antigénicas, las que son de mayor utilidad para la clasificación de las bacterias. No obstante que algunos de estos procedimientos también se han aplicado en la identificación de los dermatofitos, (Georg, 1957, Philpot, 1977).

Los dermatofitos empleados en este estudio, fueron obtenidos de cultivos conservados en agua destilada durante dos años, cuyas características morfológicas de la colonia gigante, así como las del micelio y de las estructuras de reproducción, fueron similares a las observadas por Beltrán, 1990, quien estudió las variaciones morfológicas de cultivos de dermatofitos conservados en agua destilada.

De los diferentes métodos de microcultivos en portaobjetos publicados se eligió el propuesto por Riddell, (1950), considerado como un buen método, para comparar la eficacia de las la minillas siliconadas como una técnica de microcultivos para el estudio morfológico y determinativa de los dermatofitos.

Los resultados obtenidos con los microcultivos en laminillas siliconadas, mostraron similares características morfológicas del micelio y de las estructuras de reproducción y su disposición *in situ* que los microcultivos practicados con la técnica de Riddell, pudiendo ser útil para la determinativa y adecuado para estudios morfológicos.

La esporulación se observó en una zona de aproximadamente 2 cm por encima y alrededor de 1 cm por debajo de la superficie del medio líquido, probablemente debido a una mayor concentración de oxígeno en esta zona, ya que en el extremo opuesto de la laminilla, el crecimiento, es menor y sólo se encontró micelio sin elementos de reproducción .

El desarrollo de los dermatofitos observado a los 8 días, empleando la técnica de Riddell, fué el adecuado para obtener una buena esporulación y por tanto llegar a la determinativa de estos. En lo que respecta al desarrollo de estos microorganismos empleando laminillas siliconadas se apreció un buen desarrollo y con esto una buena esporulación en los cultivos de 10 días.

La concentración de oxígeno a la que estuvieron sujetos estos, pudo haber sido una limitante para su rápida esporulación, ya que estos son microorganismos aeróbios.

Aunque pudiera parecer una desventaja del método, posiblemente tendría aplicación para estudios morfológicos o citoquímicos de organismos microaerofílicos y aún de anaerobios, empleando medios de cultivo con bajo potencial de oxido-reducción.

Por lo que respecta a los medios de cultivo utilizados se observó en los microcultivos de Riddell con medio de Sabouraud buen desarrollo de las diferentes especies de dermatofitos probados, sin embargo, los medios de agar papa dextrosa y agar papa zanahoria, quizá por su menor valor nutritivo propiciaron la esporulación más temprana y más abundante que el medio de Sabouraud. Comportamiento similar se obtuvo con los microcultivos desarrollados en laminillas siliconadas.

En el caso de los microcultivos de Nocardia los medios de cultivo mostraron buen desarrollo sin que las características de esporulación se favorecieron con alguno de ellos.

Los dermatofitos crecen adhiriéndose fuertemente a la superficie de las laminillas siliconadas, debido probablemente al contenido de lípidos, al igual que las Micobacteriae y las Nocardiae, aunque éstas con mayor contenido de lípidos en sus paredes, tienen una fuerte tendencia a moverse hacia un medio hidrofóbico, (Fisher, 1954, Palen, 1950).

Los métodos de microcultivos descritos, sobre todo los desarrollados en cajas de Petri, presentan un elevado riesgo al manejar cultivos de hongos patógenos y saprófitos, por la gran cantidad de conidios o fragmentos de hifas que son transportadas por el aire, pudiendo causar infecciones accidentales o contaminaciones indeseables. (Rippon,1990).

Estos riesgos en gran parte, se evitan con el método descrito, ya que emplea medios líquidos en tubo y las laminillas siliconadas como soporte para el crecimiento, facilitando el manejo de los microcultivos con mayor seguridad. Asimismo, las laminillas se esterilizan en autoclave o simplemente con fenol o formol, sin peligro de que se desprenda y altere el crecimiento.

Por otro lado esta técnica ofrece ventajas de orden práctico, es fácil de realizar, no es laboriosa, se pueden hacer en poco tiempo gran cantidad de microcultivos con un mínimo de contaminaciones, ocupan poco espacio durante la incubación, pueden almacenarse las laminillas esterilizadas por tiempo indefinido y utilizarse en el momento deseado, y además se logran preparaciones permanentes, útiles por mucho tiempo.

Podría considerarse como desventajas del método, la preparación de las laminillas siliconadas, pues se requiere de cierta habilidad para cortar los portaobjetos longitudinalmente en tres partes, y también el empleo del tetracloruro de carbono, reactivo tóxico y flamable.

CONCLUSIONES.

La técnica de laminillas siliconadas es una alternativa para el estudio morfológico y con este, llegar a la determinativa de diferentes especies de hongos patógenos, con un menor riesgo de contagio y una mayor rapidez en su realización.

El método puede tener aplicación amplia en estudios morfológicos, citológicos, fisiológicos, bioquímicos, etc, de los diferentes microorganismos de interés, tanto taxonómico como clínico.

Los resultados obtenidos en las especies de dermatofitos garantizan su aplicación en la determinativa de estos hongos. En el caso de las especies del género Nocardia puede ser un excelente método, sobre todo en las especies de Actinomadura y Streptomyces, donde existen serias dificultades para el estudio microscópico de los actinomicetes de importancia médica.

El método ofrece varias ventajas, como rapidez en su ejercicio, fácil de desarrollar, evita contaminaciones, es seguro y económico, no ocupa mucho espacio en la incubación, puede montarse en cualquier momento, por lo que lo considero un buen método de elección para el estudio de este tipo de hongos.

APENDICE I

MEDIOS DE CULTIVO Y TECNICAS DE COLORACION

AGAR SABOURAUD DEXTROSA

Dextrosa.....40 gr
Peptona.....10 gr
Agar.....15 a 20 gr
Agua destilada 1000 ml
pH del medio..5.6

Preparación: Disolver las substancias en el orden dado, en agua destilada, dejar en reposo. calentar a punto de ebullición con agitación continua para fundir el agar.

Esterilizar en el autoclave a 121° C durante 15 minutos.

AGAR PAPA DEXTROSA.

Pulpa de papa.....20 gr
Dextrosa.....20 gr
Agar.....15 a 20 gr
Agua destilada.....1000 ml.

Preparación: Cortar finamente la papa, colocar los cortes en un matraz Erlenmeyer con 200 ml de agua destilada y llevar a baño María a 60° C durante 1 hora, agitando ocasionalmente el matraz. Filtrar posteriormente en gasa y agregar 800 ml de agua destilada. Adicionar 2 gramos de agar por cada 100 ml de medio, disolver el agar por calentamiento y esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

AGAR PAPA ZANAHORIA

Pulpa de zanahoria.....20 gr
Pulpa de papa.....20 gr
Agar.....15 a 20 gr
Agua destilada.....1000 ml

Preparación: Cortar finamente la pulpa de zanahoria y papa, colocar los cortes en un matraz Erlenmeyer con 200 ml de agua destilada y llevar a baño María a 60° C durante 1 hora, agitar ocasionalmente el matraz. Filtrar posteriormente en gasa y agregar 800 ml de agua destilada. Adicionar 2 gramos de agar por cada 100 ml de medio, disolver el agar por calentamiento y esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

Los componentes del medio ya sea por reactivos individuales o por mezclas comerciales (Difco, Bioxon, Merck), deben disolverse completamente en agua destilada, calentando la solución sin llegar a la ebullición. Debe ajustarse el pH al valor indicado y el medio se distribuirá en los recipientes adecuados para su manejo y esterilización a 121° C durante 15 minutos.

En el caso de utilizar tubos, estos de preferencia serán de 16 X 150 mm y deberán colocarse en posición inclinada para su solidificación. Previamente a su uso deberán someterse a prueba de esterilidad, incubándolos a 48 y 72 horas a 37° C. No deberá utilizarse tubos con tapón de rosca.

1.- TINCION CON AZUL DE ALGODON ACETICO

Azul de algodón.....0.5 gr
Acido acético.....3.0 ml
Agua destilada.....97.0 ml

Disolver el colorante en agua destilada y agregar los 3 ml de ácido acético.

2.- AZUL DE ALGODON.

Azul de algodón0.05 gr
Glicerol.....40.0 ml
Fenol (Cristales).....20gr
Acido láctico.....20 ml
Agua destilada.....20 ml

Disolver el fenol en ácido láctico, posteriormente se agrega agua y glicerol, calentando ligeramente, por último se adiciona el azul de algodón.

3.- TINCION DE ZIEHL-NEELEN

SOLUCION A, CARBOLFUCSINA:

Fucsina básica.....3.0 gr

Alcohol etílico 95%100.0 ml

SOLUCION B.

Fenol fundido.....5.0 ml

Agua destilada.....95.0 ml

Mezclar 10.0 ml de la solución A con 90.0 ml de la solución B. Filtrar antes de su uso y guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

ALCOHOL-ACIDO.

Alcohol etílico 95%.....97.0 ml

Acido clorhídrico concentrado.....3.0 ml

Mezclar y colocar en una piseta.

COLORANTE DE CONTRASTE.

Azul de metileno.....3.0 ml

Agua destilada.....100.0 ml

Disolver en un mortero, filtrar y colocar en un frasco gotero.

PROCEDIMIENTO DE COLORACION.

- 1) Fijar la muestra por calor.
- 2) Cubrir la preparación con la solución de carbolfucsina y calentar suavemente a emisión de vapores durante 5 minutos. Cuidar que no llegue a la ebullición.
- 3) Decolorar con alcohol ácido, hasta la desaparición del colorante.
- 4) lavar enseguida con agua de la llave.
- 5) Contrastar con la solución acuosa de azul de metileno durante 2 minutos.
- 6) Lavar con agua de la llave el exceso de colorante y secar al aire.
- 7) Observar al microscópio con objetivo de inmersión.

4.- COLORACION DE SCHIFF

Acido peryodico.....5.0 gr
Agua destilada.....100.0 ml

SCHIFF LEUCOFUCHSIN REAGENT (LILLIE MODIFICADO)

Fucsina básica.....1.0 gr
Meta-bisulfito de sodio.....1.0 gr
Acido clorhídrico (densidad 1.119).....1.6 ml
Agua destilada.....100.0 ml

Disolver la fucsina en agua destilada, agregar el ácido clorhídrico y el meta-bisulfito de sodio, agitar. Decolorar por adición de 0.25 gr de carbón activado. Agite 2 ó 3 minutos. Filtre a través de papel filtro.

Si el filtrado no es incoloro repita el paso de decoloración.

PROCEDIMIENTO DE COLORACION

- 1.- Tratar el frotis con ácido peryódico al 5% por 5 minutos.
- 2.- Lavar en agua corriente por 2 minutos.
- 3.- Poner en fucsina básica por 2 minutos.

4.- Lavar por 2 minutos con agua corriente.

5.- Sumergir el portaobjetos en una solución de Metabisulfito de sodio por 3-5 minutos.

6.- Lavar con agua corriente.

7.- Secar.

8.- Observar al microscópio.

Refrigerar este reactivo en botella oscura. El reactivo puede ser usado tanto tiempo como permanezca incoloro.

REFERENCIAS.

Ballows, A., and W.J. Howsler. 1981. Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections. American Public Health Association. Inc. 6th Edition.

Beltran, P.L. 1990. Evaluación del Método de Conservación de los dermatofitos más frecuentes en México. I.P.N.- Esc Nac Ciencias Biológicas.

Beneke, S.D., AND L.A. ROGERS 1980 . Medical Mycology Manual. Burgess Publishing Company. MINNAPOLIS U.S.A.

Burdon, L.K., P.R. Williams. 1985: Microbiología. Ed. Publicaciones Culturales. México.

Conant, N.F., D.I. Smith., R.D. Baker., J.L. Callaway., D.S.Martin. 1973. Manual de Micología Clínica. Ed. Interamericana. México.

Emmons, C.W. 1934. Dermatophytes. Nature gruping based on the form of the spores and organs. Arch. Dermatol. 30:337-362.

Fisher, M.W. The growth of tubercle bacilli in silicone coated glass tubes, J. Bacteriol., 1954, 67, 613.

Georg, L.K, and L.B. Camp. 1957. Routine nutritional test for the identification of dermatophytes. J. Bacteriol., 74,477-490.

González, O.A. 1974. Dermatofitosis de la piel lampiña. El Médico. Año 24(8):39-49.

González, O.A.y P. Lavalle. 1947. Dermatofitos Causantes de las diversas tiñas de la piel lampiña observadas en nuestro medio. Rev. del Inst. de Salubr. y Enferm. Trop. (México), 8:265-272

González, O.A., V.C. Orozco. 1974. Frequency of occurrence of principal Dermatophytoses and their causative agents observed in Mexico city. Int. Journ. of Dermat. 13:303-309

González, O.A., V.B. Romo. 1945. Dermatofiros causantes de tiña de la piel cabelluda en la Ciudad de México. Rev. Inst. de Salubr. y Enferm. Trop. (México), 6:145-148

González, O.A., V.C. Orozco. 1957. Dermatofitos causantes de "Tinea Unguis" en México. Rev. Inst. de Salubr. y Enferm. Trop. (México), 17:93-95

González, O.A., J. Córdova. 1957. El factor sensibilización en las dermatofitosis de la piel lampiña. Rev. Inst. de Salubr. y Enferm. Trop. (México), 17:107-113

Henricis. 1951. Molds yeast and Actinomycetes, 2 th Edition

Higaschi, K, Tsukuma, and M. Naito. 1962. Silicone coateo slide culture method for tubercle bacilli. Am. Rev. of. Resp. Dis. 85:392-397.

Matthem, J.L., AND S.Stanley. 1972. Métodos de Laboratorio. Ed. Interamericana. México.

Palen, M.I., H.Y. Woong., and E.Leifson. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum by pepsin digestion and interface concentration with pentane, Amer Rev Tuberc, 1957. 75, 148.

Philpot, C.M. 1977. The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. Sabouraudia, 15:141-150.

Riddell, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia. 42:265-269, 1950.

Rippon, W.J. 1990. Tratado de Micología Médica. Ed. Interamericana. 3er Edición. México.

Rivalier, 1954.

Segretain, G., E.Drouhet., AND., F. Mariat. 1966. Diagnostic de Laboratoire en Mycologie Médicale. Editions de la Tourelle. Francia.

Shibayama, (comunicación personal).

Taplin, D., AND G.Rebell. 1964. Dermatophytes. Their Recognition and Identification. University of Miami Press. 2th Edition. Florida.

TMS-227-8. 1964. Technical Manual. Laboratory Procedures in Clinical Mycology. Department of the Army. Washington. D.C.

Trujillo, G.A., D. Garza. 1989. Manual de Micología Médica. Departamento de Microbiología. E.N.C.B.-I.P.N.

Zapater, R.C. 1958. Los hongos patógenos y las micosis. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.

Zapater, R.C. 1981. Micología Médica. Diagnóstico y Tratamiento. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.