

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

TESIS CON EL NOMBRE DE:

“OBTENCIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO DE CONIDIACIÓN DE LOS  
DERMATOFITOS “

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

JESUS ARROYO ROSALES.

ANA LILIA GUTIERREZ ROMERO

ASESOR DE LA TESIS : Q.B.P. RUTH PAZ GONZÁLEZ.

DIRECTOR DE LA TESIS: Q.F.B LUIS ALFREDO MORA GUEVARA.

MÉXICO D.F. 1998.

TESIS CON  
FALLA DE

262051



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 esta 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.

## DEDICATORIA.

Con amor y orgullo de ser su hijo, quiero dedicar este trabajo a mis padres, Teresa y Jesús que han sido un ejemplo de lucha y responsabilidad a seguir.

Por lo que les agradezco infinitamente el amor y cariño que me han brindado, así como sus consejos, confianza, regaños, paciencia y apoyo incondicional para seguir adelante y terminar mi carrera profesional de Q.F.B.

A mis hermanos ( Lupe, Alicia, Rosa, Leticia, Graciela y Jose Antonio ) por que siempre han estado a mi lado en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros y amigos con quien pase momentos muy gratos y de quienes recibí consejos y ayuda en algún momento

A mi compañera, amiga y novia Ana Lilia Gutiérrez a quien yo quiero mucho. Por haber compartido momentos difíciles y buenos durante toda la carrera, así como por su ayuda , confianza y cariño.

A todos mis profesores de los cuales tengo recuerdos gratos, ya que gracias a ellos se logró concluir mis estudios profesionales.

En especial quiero darle las gracias por sus consejos, confianza y dedicación a los profesores Luis A. Mora, Ruth Paz y Antonio Kapón.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	5
TIÑAS.....	8
AGENTES ETIOLÓGICOS.....	14
GENERO TRICHOPHYTON.....	14
GENERO MICROSPORUM.....	14
GÉNERO EPIDERMOPHYTON.....	14
IDENTIFICACIÓN DE LOS DERMATOFITOS.....	16
DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	17
CARACTERÍSTICAS PARA FAVORECER LA CONIDIACIÓN.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
HIPOTESIS.....	24
MATERIAL.....	25
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
CONCLUSIONES.....	45
GLOSARIO.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	49
INDICE DE ANEXOS.....	51
ANEXO 1. "ESQUEMAS DE LOS DERMATOFITOS".....	52
ANEXO 2 "METODOLOGÍA Y TÉCNICAS".....	56
ANEXO 3 "TABLAS DE TRABAJO".....	63

# OBTENCIÓN DEL PUNTO ÓPTIMO DE CONIDIACIÓN DE LOS DERMATOFITOS

## RESUMEN

Los dermatofitos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y en substratos que tienen queratina tales como la piel y las uñas de animales y el humano. El término dermatofito fue definido por Hawksworth como un hongo parasitante de tejido queratinizado de la piel y anexos (pelos, pestañas, cejas y uñas) de hombres y animales y causantes de dermatofitosis (tiña o tinea) (23)

Estos hongos, se han clasificado siguiendo las reglas de nomenclatura y taxonomía botánicas, en 3 géneros, *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*

La comprensión de las micosis requiere del conocimiento del parásito y del huésped. Estas relaciones parasito-huésped constituyen la esencia del estudio de las micosis, así como de todas las enfermedades de origen infeccioso, su estudio se apoya en los datos proporcionados por los laboratorios

La identificación de los dermatofitos se puede realizar por diversos métodos en el laboratorio:

- 1) La observación de la morfología colonial y la morfología microscópica, mediante el adecuado cultivo y el uso de la técnica del microcultivo (Para optimizar este proceso se requiere conocer los tiempos óptimos de conidiación mediante la microscopía óptica, de transmisión y de barrido)
- 2) Pruebas bioquímicas para los dermatofitos
- 3) Pruebas inmunológicas de identificación de los dermatofitos.

Se sabe que las *macroconidias* son el rasgo principal para identificar a los dermatofitos. La mayor distinción entre *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* es la naturaleza de la pared celular de la macroconidia: rugosa en el primero y lisa en los últimos

Por lo que se elige en nuestra investigación la observación de la morfología colonial y microscópica (*macroconidias*, *microconidias*, forma de las hifas, etc.) mediante el adecuado cultivo, el uso de la técnica de microcultivo y observación por microscopía óptica de las laminillas, para conocer los tiempos óptimos de conidiación

A su vez se logró modificar la técnica de tinción de azul de Anilina Lactofenol con un tiempo de exposición en la preparación de 2 horas a temperatura ambiente (Anexo 2), optimizándose el tiempo de tinción. Se ha definido el tiempo óptimo de crecimiento y conidiación en 12 de 13 dermatofitos en agar glucosa Sabouraud, para este fin se utilizó el medio de Borelli que favorece la conidiación de algunas especies como medio de enriquecimiento

En el aspecto didáctico y aplicable en la docencia se generaron 432 preparaciones fijas, 20 diapositivas de morfología colonial desde diversos ángulos de los 13 dermatofitos, 100 diapositivas y 26 fotografías de morfología microscópica tomadas en el fotomicroscopio Olympus a inmersión débil y fuerte, en donde se muestran las características de las especies de dermatofitos que se encuentran en el cepario.

# INTRODUCCIÓN

## ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Las micosis fueron descritas por los griegos y los romanos, los primeros les llamaron herpes por su forma circular, y los segundos, tinea (tiña) que significa larva o polilla

En el siglo XVII en México se utilizaba la "calota" como tratamiento en indígenas tarahumaras, no sin antes encomendarlos a Justo Mártir, el santo de las tiñas; el tratamiento consistía en un birrete preparado con resinas calientes que se aplicaban en la zona afectada, dejándolo secar y luego se arrancaba bruscamente, de esta manera se desprendían las escutulas del *favus*, pero se producían grandes hemorragias. (16)

El término dermatofito significa "planta de piel". No se conoce cuando y quién acuñó el término "Dermatofito"

En un suplemento para el diccionario Inglés de Oxford se documenta como sigue: 1882 Syd Soc Lex II Dermatophytico Relativo o perteneciente a *dermatophytos*. Hawksworth definió el término dermatofito como sigue "un hongo parasitante de tejido queratinizado (pelo, piel y uñas) en hombres y animales, son causantes de dermatofitosis (tiña, tinea). Estos hongos, los cuales son típicamente *Hyphomycetas* con teleomorfismo en Gymnoascaceae (Eurotiales), ha sido frecuentemente tratado como un grupo especial los "Dermatofitos u Hongos de tiñas. La tiña es cosmopolita y los hongos de tipo dermatofito se encuentran ampliamente en suelo y en substratos que contienen queratina tales como nidos de pájaro" (27)

En 1890 Sabouraud inició el estudio sistemático de las dermatofitosis y en 1910 publicó una enciclopedia, cuyo tercer volumen "Les Teignes", se considera como una obra clásica de la literatura médica, clasificando por primera vez a los dermatofitos en 4 géneros, *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* y *Achorion*

En 1934 Emmon, siguiendo las reglas de nomenclatura y taxonomía botánicas, clasificó a los dermatofitos en sólo 3 géneros, *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*, el cual no incluía al género *Achorion*. Pese a la poca importancia clínica de las micosis superficiales, es interesante señalar que los dermatofitos estuvieron a punto de cambiar la historia, pues en 1942, durante la 2ª guerra mundial muchos soldados británicos aliados presentaron formas incapacitantes de "tiña de los pies" lo cual dio lugar a la obra "Fungi go to war"

En 1945, Latapi describió en México los primeros casos de Tokelau en la sierra Norte de Puebla. En 1977, Ajello hizo una revisión histórica y señaló que el conocimiento sobre dermatofitos ha sido paralelo al desarrollo de la *micología médica en general*. (5)

## CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS.

Clasificación de Whitaker (1969):

REINO:

- Animal
- Vegetal
- Fungi. Hongos
- Protista
- Monera.

## Taxonomía del Reino Fungi.

La taxonomía de los hongos se basa principalmente en criterios morfológicos y en las características de las estructuras de reproducción sexual

Los hongos pertenecen al reino Fungi, cuya división Eumycota comprende los hongos verdaderos con pared que pueden tener una reproducción sexual o asexual

Clase	
• Zygomycetes	Reproducción asexual y sexual
• Ascomycetes	"
• Basidiomycetes	"
• Deuteromycetes	Reproducción asexual

La reproducción se realiza por medio de esporas y puede ser sexual o asexual. Las esporas que se reproducen sexualmente tienen núcleos derivados de las células originales, las esporas asexuales, se producen por simple diferenciación del talo en crecimiento. El hongo está constituido por hifas que en conjunto forman micelio aéreo, o micelio vegetativo

- Hifas. Es una cadena de células que pueden ser sexuadas o asexuadas, en formación, ya sea en forma de cadenas transversas o tabiques, a medida que las hifas crecen se ramifican y se forma un micelio
- Micelio aéreo. Este micelio crece y se eleva por arriba del sustrato y en ocasiones es el encargado de soportar el esporangiosporo.
- Esporangiosporo: Estructura del hongo que se encarga de guardar a las esporas.
- Micelio vegetativo: Este micelio crece y penetra al interior del sustrato, absorbiendo de esta manera el alimento
- Espora. Unidad estructural reproductiva de alta resistencia que al separarse del organismo es capaz de dar lugar a otro organismo nuevo

El comportamiento de los hongos es variado y pueden ser:

- ♦ Saprófitos - Pueden descomponer organismos muertos o sus productos.
- ♦ Simbióticos - Asociación de hongos y raíces de plantas, para incrementar la absorción de nutrientes del suelo
- ♦ Parásitos - Los parásitos fungicos originan el 70 % de las enfermedades importantes, tanto en animales y vegetales como en el humano. (5)

Los hongos son microorganismos eucarióticos (células con núcleo) pueden ser unicelulares o pluricelulares, uninucleadas o multinucleadas. Además son quimiorganotróficos, la mayoría producen aflotoxinas que poseen de 1 a 2 núcleos de cumarina, la cual es muy tóxica para los seres vivos

La pared de los hongos puede ser de quitina o de celulosa, los hongos se consideran saprófitos o saprobios (pueden alimentarse de materia orgánica en descomposición), se alimentan de C, H, O, N y algunos oligoelementos como son F, Cu, Mg, Mn, Fe, Zn, son aerobios, ligeramente acidófilos ( crecen a un pH de 5 a 7 ), pueden ser

- Psicrófilicos : Crecen de 4 - 20°C.
- Mesófilicos . Crecen de 20 - 40°C.
- Termófilicos : Crecen de 40 - 70°C
- Dimórficos : Posee diferente morfología.
- Polimórficos : Presenta varios tipos de cuerpos fructíferos.
- Pleomórficos : Presentan diferentes formas

Los hongos no son fotosintéticos, carecen de clorofila. Se reproducen de manera natural por medio de esporas (casi todas las partes de un hongo son potencialmente capaces de desarrollarse y dar un nuevo individuo)

Se ha aceptado que muchos hongos son polimórficos, una sola especie de hongos puede producir varios tipos de cuerpos fructíferos. El propágulo producido después de una fisión nuclear y meiosis es referido como espora sexual, el estado caracterizado por esporas sexuales se ha designado como estado perfecto y aquel caracterizado por conidias asexuales o la ausencia de conidias, como estado imperfecto. Para precisar el estado de los hongos Hennerbert y Wensesub introdujeron los términos Anamórfo para las formas reproductivas asexuales ó somáticas, Teleomorfo para formas reproductivas sexuales y Holomorfo para los hongos que incluyen a ambos, Anamórfo y Teleomórfo. Epidermophyton, Microsporium y Trichophyton son los géneros Anamórficos que incorporan los dermatofitos

Los Teleomórfo de muchas especies de dermatofitos y hongos relacionados son clasificados en la familia Arthrodermataceae.

Los Teleomorfos de la mayoría de las especies de dermatofitos son antropofílicos y zoofílicos.

Las dificultades en la obtención de un Teleomorfo pueden atribuirse al heterotalismo, naturaleza del medio de cultivo, reactividad sexual y/o degeneración sexual de la cepa

Taxonomicamente, los dermatofitos en su fase Teleomórfica se clasifican dentro de la clase Ascomycetes, puesto que se reproducen mediante ascas y ascosporas.

Pertenece al Orden Eurotiales. Familia Gymnoascaceae, porque los cuerpos fructíferos de estos hongos tienen su pared incompleta

El Género Arthroderma tiene sus hifas peridiales cortas y delgadas en la parte central, mientras que en los extremos están considerablemente dilatados pudiendo ser simétricas o no. Estas hifas se comparan con pequeños huesecillos

*Epidermophyton floccosum*, las especies de *Microsporium* y *Trichophyton*, en las que no se ha comprobado la fase teleomórfica se clasifican dentro de los *Deuteromycetes*, Subdivisión *Deuteromycotina*, que de acuerdo a la manera con que se reproducen los conidios corresponden a los *Hyphomycetes* (38)

### CUADRO 1 Clasificación Taxonómica de los Dermatofitos

#### SEXUADOS

- Reino Fungi
- División Eumycota
- Subdivisión Ascomycotina.
- Clase Euascomycetes.
- Orden Eurotiales
- Familia Arthrodermataceae ( Gymnoascaceae )
- Género *Arthroderma*.

#### ASEXUADOS

- Subdivisión *Deuteromycotina*.
- Clase *Hyphomycetes*.
- Orden *Moniliales*.
- Familia *Moniliaceae*.
- Género *Epidermophyton*.
- Microsporium*.
- Trichophyton*.



## DERMATOFITOSIS (TIÑAS)

En el humano las infecciones causadas por hongos microscópicos se llaman micosis, estas van a tomar el nombre de la parte del organismo que invaden; por ejemplo onicomicosis, a los que afectan a las uñas o del hongo que las causa por ejemplo la Coccidioidomicosis causada por el *Coccidioides immitis*. Los agentes de las micosis pueden ser endógenos o exógenos, los hongos endógenos se encuentran en mucosas o tegumentos de individuos sanos y solo en condiciones de riesgo o especiales que presenta el huésped (inmunodepresión, diabetes, antibioterapia, etc.) se convierten en patógenos y los exógenos se encuentran en el exterior del individuo como es la piel.

Una de las clasificaciones más conocidas y aceptadas es la que se dividen a las micosis según su localización en 4 grandes grupos: Superficiales, Subcutáneas, Sistémicas y Oportunistas.

En general las micosis Superficiales se producen por contacto directo con el hongo, con la persona o animal infectado, afectando la piel, anexos y/o mucosas.

Las micosis Subcutáneas y Sistémicas se pueden agrupar en las micosis profundas. Las micosis Subcutáneas por lo general se adquieren del ambiente y el hongo penetra por traumatismo de la piel. En la micosis Sistémica las esporas del hongo penetran por inhalación y producen generalmente micosis pulmonar primaria de donde pueden diseminarse a cualquier otro órgano o sistema, por lo tanto las micosis son de evolución subaguda o crónica, pueden durar años y ser letales.

Las micosis oportunistas son causadas por hongos saprobios que se transforman en patógenos bajo diferentes condiciones del huésped (inmunodepresión, diabetes, antibioterapia, etc.)

Las micosis superficial llamadas Dermatomofitosis o Tiñas, son infecciones que atacan principalmente el pelo, la piel y las uñas. Los agentes causales son los parásitos estrictos de la queratina que suelen producir lesiones circunscritas al estrato corneo, siendo excepcional la invasión de la epidermis profunda. (9)

Los agentes causales importantes son hongos dermatofitos que corresponden a un grupo de hongos miceliales integrados dentro de los géneros Trichophyton, Microsporum y Epidermophyton, en general se caracterizan por:

1. Su queratinofilia, es decir, su aptitud por desarrollarse sobre la queratina, ( escleroproteína insoluble presente en la piel y anexos)
2. Su actividad queratinolítica, ( capacidad de producir enzimas que permitan la asimilación de la queratina como nutriente del hongo).
3. La producción de macroconidias, que aunque variadas en su estructura y frecuencia confieren características morfológicas similares a las diferentes especies.
4. La posibilidad de ocasionar contagio, sea por transmisión directa de persona a persona o entre animales. (38)

Los dermatofitos se han clasificado con base en sus características morfológicas, su patogenicidad para el humano, las regiones corporales que afectan más frecuentemente, su distribución geográfica, las principales fuentes de infección y tipo de reproducción. (14)

De acuerdo con lo anterior, las dermatofitosis se han clasificado de la siguiente manera: (4, 11)

<b>CUADRO 2</b>	
<b>CLASIFICACION DE LAS DERMATOFITIS</b>	
<b>I. Formas Superficiales de Tiñas</b>	
Tiña de la cabeza	
Tiña del cuerpo.	
Tiña imbricada	
Tiña inguinal.	
Tiña de la mano	
Tiña de los pies.	
Tiña de las uñas	
<b>II- Formas Profundas de Tiñas</b>	
Dermatofitosis inflamatorias	
Querion de celso.	
Favus	
Tiña de la barba	
Granuloma tricoftico.	

De acuerdo a su hábitat natural los dermatofitos, pueden ser divididos en tres categorías Antropofílicos, Zoofílicos y Geofílicos. Los dermatofitos antropofílicos tienen como huésped principal al humano, raras veces infectan a animales. Los dermatofitos zoofílicos tienen a animales inferiores como sus huéspedes básicos, sin embargo son capaces de infectar humanos. Algunos dermatofitos antropofílicos y zoofílicos se han especializado para una especie de huésped en particular y grupo de poblaciones. Las especies antropofílicas y zoofílicas de los dermatofitos no pueden sobrevivir y proliferar en suelo como saprófitos. Los dermatofitos geofílicos son las especies que viven en el suelo como saprófitos y también tienen la habilidad para invadir tejido queratinoso de animales inferiores y humanos. Las especies Geofílicas de los tres géneros que no tienen la habilidad para infectar animales ni humanos, son no patógenas y por lo tanto no son dermatofitos, estos pueden ser reconocidos simplemente como miembros de los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* (27)

Se han identificado 41 especies de dermatofitos, de los cuales 18 se han encontrado en México, pero sólo cinco son de incidencia frecuente e importantes como patógenos (9)

**CLASIFICACION DE GENEROS Y ESPECIES ANAMORFOS DE  
DERMATOFITOS** (14, 16, 27)

<b>CUADRO 3</b>		
<b>LOS DERMATOFITOS PATÓGENOS DEL HOMBRE</b> (distribución y ecología)		
COSMOPOLITAS		
ANTRÓPOFILICOS	ZOOFILICOS	GEOFILICOS
<i>T. rubrum</i> 1*	<i>M. canis</i> 3*	<i>M. gypseum</i> *
<i>T. tonsurans</i> 2*	<i>M. nanum</i> *	<i>M. fulvum</i>
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> 4*	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> *	<i>T. ajelloi</i> **
<i>T. violaceum</i> *	<i>T. verrucosum</i> *	<i>T. terrestre</i> */**
<i>M. audouinii</i> *	<i>T. equinum</i> *	
<i>T. schoenleimii</i> *	<i>M. gallinae</i> *	<i>M. vanbreuseghemi</i>
<i>L. floccosum</i> 5*	<i>M. equinum</i>	<i>M. anamorfo de A. cookiellum</i> **
DISTRIBUCIÓN LIMITADA		
<i>T. concentricum</i> *	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>M. ferrugineum</i> *		<i>M. cookei</i>
<i>T. gourvilli</i>	<i>T. simii</i>	<i>I. georgiae</i> **
<i>T. megninii</i>	<i>M. persicolor</i> *	<i>T. gloriae</i> **
<i>T. soudanense</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i>	<i>I. longifusus</i> **
<i>T. yaoundei</i>		<i>T. phaseoliforme</i>
<i>T. ochraceum</i> *	<i>M. amazonicum</i>	<i>T. vanbreuseghemi</i>
1-5 Especies predominantes en la República Mexicana		<i>M. praecox</i> <i>E. stockdaleae</i> ** <i>M. boullardii</i> ** <i>M. ripariae</i> ** <i>T. marianii</i> **
• Especies conocidas en México		
** No patógenos		

Para adquirir la enfermedad se precisa contacto con la fuente que puede ser **Zoofílico** ( de animales a humanos ), **Geofílico** ( de suelo a humano ) y **Antropofílico** ( de hombre a hombre )

La infección por dermatofitos se explica de la siguiente manera:

Cuando una espora se deposita en la superficie de la piel, se reproduce en la capa córnea; inicialmente origina una pápula y luego una lesión anular por la extensión radiada de los filamentos.

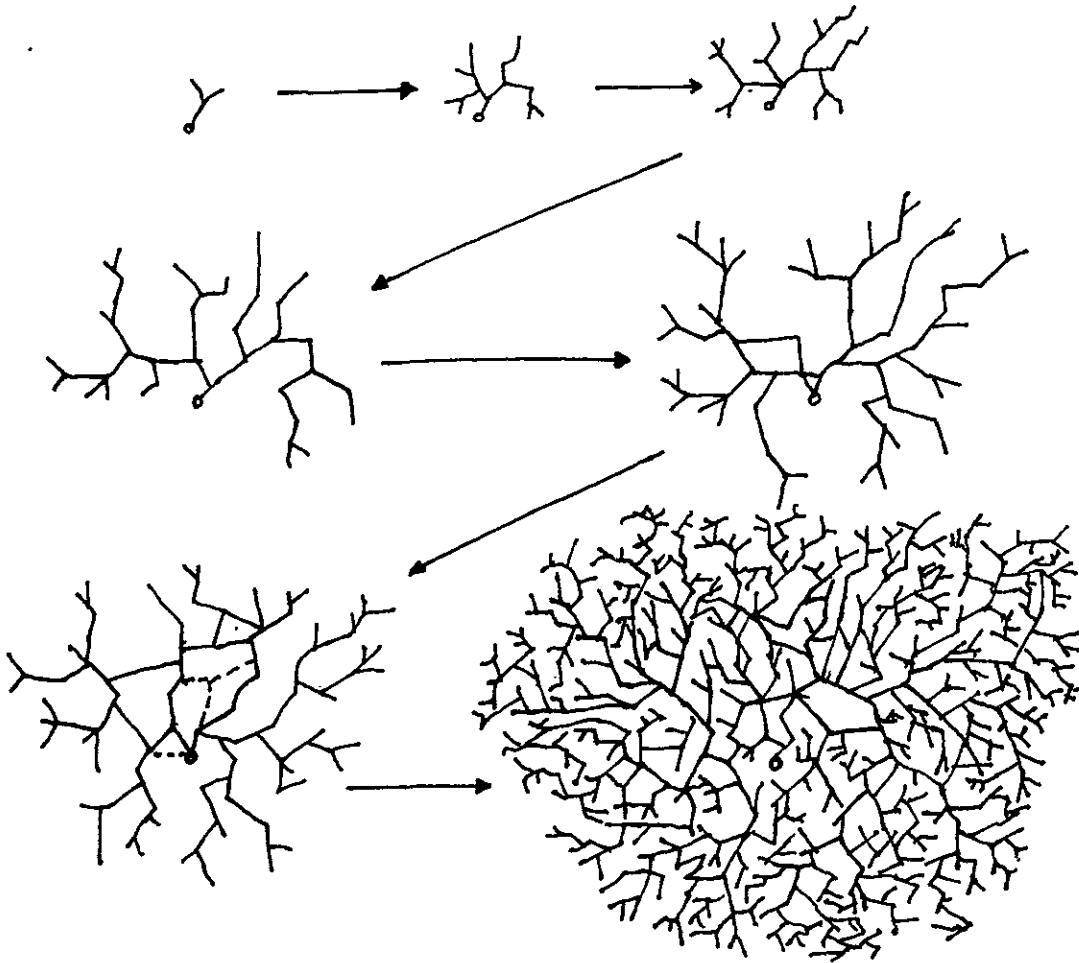


Figura 1. Esquema de la formación de la colonia ( 5 )

También puede ocurrir parasitación de los vellos y de este modo actúa como reservorio. En la piel cabelluda el hongo se reproduce en la capa córnea y a nivel del orificio folicular, penetrando e invadiendo la vaina del pelo, se extiende hacia la profundidad sin sobrepasar la zona queratogena ( franja de Ademson); al mismo tiempo se extiende hacia la parte distal del pelo y lo transforma en un pelo grueso y frágil que se rompe con facilidad ( pelo tiñoso) Los arthroconidios pueden invadir la vaina del pelo sin destruir la cutícula ( endotrix) o perforar y alterar esta última produciendo una vaina externa de conidios ( ectotrix )

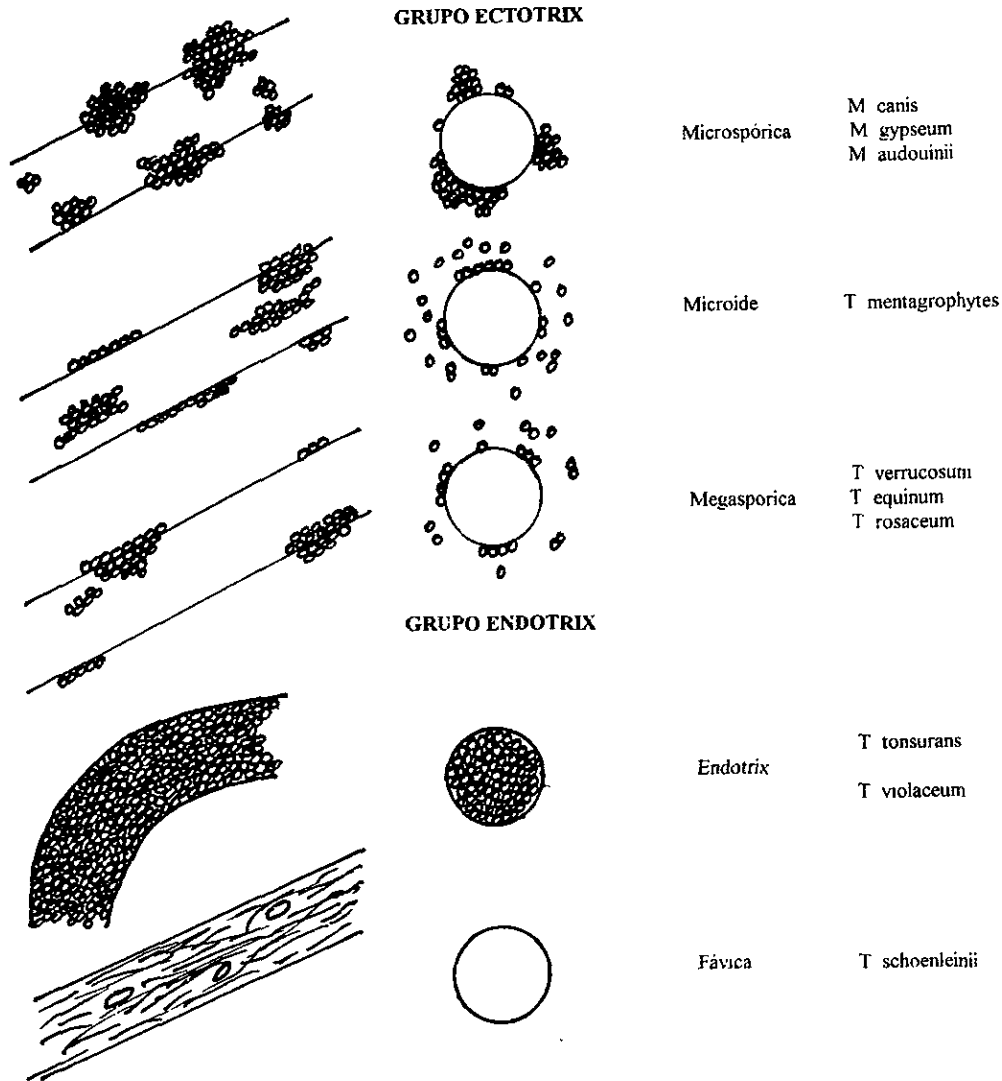


Figura 2. Tipos de parasitación de los dermatofitos en el pelo ( 23 )

En uñas el dermatofito penetra por la queratina blanda del *hiponiquio*; por el borde lateral de la uña o por la lúnula y afecta el *hiponiquio*, más rara vez puede hacerlo por la superficie de la lámina ungueal. Después afecta el lecho y en la uña misma se extiende por una red de túneles escavados en la queratina dura, sin invadir la matriz. El hongo penetra en los corneocitos o sólo los separa *mecánicamente*, la colonización produce una reacción del huésped debido a los productos metabólicos del hongo como son las queratinasas, proteasas, elastasas y lipasas. En algunos pacientes hay reacción inflamatoria intensa, en otros es mínima.

El grado de la respuesta depende de dos factores :

- 1- De la especie causal .
- 2- Del grado de hipersensibilidad del huésped.

Los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* se distinguen entre sí por sus características microscópicas, esto es por sus conidios y macroconidias, en especial por sus macroconidias que son específicos de cada género. ( 11)

Las diferencias morfológicas microscópicas en que Emmons se basó para clasificar a los dermatofitos ( 1934 ) en los tres generos clásicos, fueron las características de los conidios

## AGENTES ETIOLÓGICOS.

### GENERO TRICHOPHYTON.

( Malmsted, 1845 ). Las especies de *Trichophyton* atacan el pelo, piel y uñas. En los pelos infectados pueden descubrirse *artrosporas dispuestas en hileras paralelas en el interior del pelo (tipo endothrix)* o en hileras también paralelas fuera del pelo ( tipo ectothrix )

Por examen macroscópico la colonia tiene aspecto algodonoso, granular, polvoriento o veloso, liso o céreo. La pigmentación varía notablemente ya que los cultivos pueden ser blancos, rosados, rojos, purpúreos, violetas, anaranjados, amarillos a pardos.

Por examen microscópico se caracteriza por sus macroconidias ( husos ) como grandes estructuras fusiformes o claviformes de no más de 50 a 60 micras de longitud por 4 a 10 micras de ancho. Sus paredes son finas ( inferior a 2 micras ) y la extremidad distal habitualmente es roma ( forma en cigarro habano ). Las paredes son gruesas o delgadas, lisas y el número de tabiques, por lo general es inferior a cinco. En la mayoría de las cepas, los macroconidios son raros, muy escasos o no existen en algunas especies, a menos que el hongo se desarrolle sobre un medio apropiado, por el contrario existe un gran número de microconidios en forma de pequeñas estructuras en maza o subsféricas, hialinas, de pared delgada, unicelulares, de 2 por 4 micras, que se originan en grupos o racimos o nacen aisladamente a los lados de las hifas ( tirso ). Pueden verse también otras estructuras, como micelio en raqueta, clamidiosporas, cuerpos nodulares e hifas en espiral. ( 7.16.38 )

### GENERO MICROSPORIUM

( Gruby, 1843 ). Las especies de *Microsporium* atacan solamente la piel o el pelo. En los pelos infectados se identifica el hongo como una vaina de mosaico de pequeñas esporas en torno al tallo piloso, los pelos infectados emiten fluorescencia verde con luz de Wood.

Por examen macroscópico los cultivos de *Microsporium* desarrolla un micelio aéreo algodonoso, lanudo, enmarañado o polvoriento cuyo color varía de ante a blanco o a matices más intensos de pardo.

Por examen microscópico posee macroconidias de paredes gruesas (3-4 micras), rugosas, fusiformes y de tamaño variable según la especie, algunas alcanzan más de 100 micras de longitud presentando también septos transversales en número de 4 a 15. La pared espinosa de los macroconidios caracteriza al género. Esta spora puede ser oval, de pared gruesa o delgada, en los lados de las hifas sesiles, o sobre cortos esterigmas, nacen pequeños microconidios, con un aspecto claviforme o piriforme, en maza de 3 a 6 micras, unicelulares. Así mismo estas son escasas y están ausentes en algunas cepas. Se advierten también hifas en raqueta, o en forma de peine, cuerpos nodulares y clamidiosporas. También cabe comprobar la ausencia de grandes macroconidios típicos multitabicados. ( 7.16.38 )

### GENERO EPIDERMOPHYTON

( Sabouraud, 1910 ). El pelo no es infectado por *Epidermophyton*, el cual solo ataca la piel y las uñas.

Macroscópicamente, su aspecto de los cultivos son, característicamente aterciopelados o polvorientos, con surcos radiales centrales y color blanco - amarillento.

Por examen microscópico sólo se producen los grandes macroconidios claviformes o piriformes, de menor tamaño que los de los otros géneros, de 15 a 25 micras de longitud por 6 a 10 micras de ancho, de pared delgada, lisa (1 a 1.5 micras), multitabicados y en maza. Por lo general no presentan más de cuatro tabiques transversales y típicamente los macroconidios se presentan agrupados en racimos. En el micelio se ven clamidiosporas e hifas en forma de raquetas, no se observa desarrollo de microconidios. ( 7.16.38 )

Los esquemas de estos microorganismos se encuentran en el anexo I.

**CUADRO 4**

**CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PRINCIPALES DERMATOFITOS (23)**

<b>Dermatofitos</b>	<b>Invasión al pelo</b>	<b>Requerimientos nutricionales específicos</b>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Ectothrix y endothrix. Cadenas de conidios tamaño mediano	No reportados
<i>Trichophyton rubrum</i>	Ectothrix y endothrix En la primera, cadena de conidios grandes; en la segunda, conidios más pequeños	No reportados
<i>Trichophyton schoenlemiti</i>	Endothrix. Hifas con burbujas aéreas en el pelo; conidios escasos o ausentes	No reportados
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Endothrix Abundantes cadenas de conidios, lo que hace que el pelo se encurve	Crece mejor en presencia de tiamina
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Ectothrix Grandes conidios en cadenas	Todas las cepas requieren tiamina
<i>Trichophyton violaceum</i>	Endothrix	Tiamina Muchas cepas requieren también inositol El crecimiento aumenta a 37°C
<i>Trichophyton concentricum</i>	No se conoce	Responde ligeramente a la tiamina en el 50% de aislamientos
<i>Trichophyton soudanense</i>	Endothrix como: <i>T. tonsurans</i> y <i>T. violaceum</i>	No crece en nitrato de amonio o histidina como fuentes de nitrógeno No se estimula con tiamina
<i>Microsporum canis</i>	Ectothrix. Masas de conidios pequeñas	Ninguno reportado Crece profusamente en arroz refinado
<i>Microsporum gypseum</i>	Principalmente Ectothrix Conidios dispersos y en cadenas	No reportado
<i>Microsporum fulvum</i>	Ectothrix. Similar a <i>M. gypseum</i>	No reportado



# IDENTIFICACIÓN DE LOS DERMATOFITOS

En general los dermatofitos y hongos relacionados han sido clasificados e identificados principalmente con base en sus apariencias macro y microscópicas, en *materiales clínicos* y cultivos, así como el modo de invasión del cabello in vivo (ectotrix, endotrix y tipo fávico) proveen una pista útil en la identificación del agente etiológico

Algunas pruebas fisiológicas que aumentan la aproximación morfológica incluyen:

- 1- Diferenciación de *M. audouinii* de *M. canis* y *M. gypseum*, por la habilidad del primero para crecer bien en granos de arroz
- 2- Pruebas de requerimiento nutricional para la diferenciación de especies. Además, reciente metodología y tecnología proveen varias herramientas taxonómicas, incluyendo:
  - a) Análisis electroforético de patrones proteínicos enzimáticos
  - b) Enfoque analítico isoelectrico de proteínas secretoras.
  - c) Descripción de diferencias antigénicas.
  - d) Análisis por cromatografía de líquido - gas - pirólisis.
  - e) Estudio de homología de DNA.
  - f) Análisis de ácidos grasos
  - g) Habilidad para perforar cabello in vitro. (27)

Existen otros métodos para la identificación de los Dermatofitos, no tan sofisticados como los mencionados anteriormente. los cuales son.

- 1- Desarrollo macroconidial revelado por microscopia óptica, de transmisión y de barrido
- 2- Pruebas bioquímicas para los Dermatofitos.
  - a) Hidrólisis de la urea
  - b) Producción de pigmento (14)
- 3- Pruebas inmunológicas de identificación de los Dermatofitos.
- 4- La observación de la morfología colonial y la morfología microscópica, mediante el adecuado cultivo y el uso de la Técnica del microcultivo, para optimizar este proceso se requiere conocer los tiempos óptimos de conidiación mediante la microscopia óptica, de transmisión y de barrido.

Se sabe que las macroconidias son el rasgo principal para identificar a los Dermatofitos. La mayor distinción entre los géneros *Microsporium*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* es la naturaleza de la pared celular de las macroconidias, rugosa en el primero y lisas en los dos últimos (4)

Por lo que se elige en nuestra investigación la observación de la morfología colonial y microscópica (macroconidias, microconidias, forma de las hifas, etc.) , mediante el adecuado cultivo, el uso de la técnica de microcultivo y la observación por microscopia óptica de las preparaciones fijas generadas, para conocer los tiempos óptimos de conidiación

Para poder evaluar el tiempo óptimo de conidiación se requiere conocer diversas técnicas asociadas en este trabajo

El diagnóstico de laboratorio de los Dermatofitos se basa en el examen directo y cultivo, siendo dicho examen un método sencillo de realizar y en manos expertas tiene un alto rendimiento (80 a 90%). Mientras que el cultivo ayuda al diagnóstico y tiene importancia en la tipificación de hongos miceliales (6)

Un estudio realizado en Cuba demuestra que el empleo combinado de la microscopía directa y el cultivo, ayuda a detectar un mayor número de Dermatofitos. Se encuentra el agente etiológico más próximo o relacionado con estas micosis, la afección clínica más frecuente, las lesiones en mas de una región corporal, así como la especie más frecuente. (14)

Para el diagnóstico con examen directo se ha utilizado también una preparación que da brillo a las telas, el blanco de calcoflúor, con el fin de aclarar la preparación. Esta sustancia se une a la quitina y a la celulosa y muestra una fluorescencia verdosa cuando es expuesta a la luz ultravioleta de onda larga. Es más fácil y rápido interpretar la preparación blanca de calcoflúor que la laminilla con KOH, pero se requiere de un microscopio de fluorescencia

La precisión en el diagnóstico es casi igual con los dos métodos, pero el blanco de calcoflúor proporciona un número excesivo de lecturas positivas falsas con los raspados de las lesiones causadas por levaduras. Con cualquiera de los metodos debe ser posible distinguir hifas y esporas (22)

Existe otra técnica confiable para identificar a los dermatofitos mediante el examen directo y cultivo, en donde la muestra se obtiene por raspado de escamas de piel, uñas y pelos, utilizando instrumental estéril. El material córneo se disgrega con KOH al 20 %, seguido de un breve calentamiento en el mechero de Bunsen. Se tiñe con Rodamina y se observó al microscopio. Las muestras fueron cultivadas en medio de agar Sabouraud glucosado al 2% con Cloranfenicol o gentamicina a razón de 100 mg / litro de medio en duplicado. Los cultivos se incubaron a 37° C hasta por 30 días. La identificación del hongo se realizó con base en la observación macroscópica de la colonia y su observación morfológica microscópica

Por lo que se afirma el alto rendimiento del examen directo (97,2 %); este metodo sencillo de realizar, de bajo costo y que se efectúa en el momento de la consulta, confirma un diagnóstico para iniciar tratamiento (6)

## DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS DERMATOFITOS.

En las estadísticas reportadas por el INDRE en 1993, en el Edo de México y el D F reportaron 85081 casos de dermatomicosis y dermatofitosis, los números de casos se anexan en la siguiente tabla. (10)

<b>CUADRO 4</b>			
<b>NÚMERO DE CASOS TOTAL DE DERMATOFITOSIS Y DERMATOMICOSIS.</b>			
Estado	Número	Estado	Número
Aguascalientes	3794	Morelos	13722
B.C.N.	8272	Nayarit	8364
B.C.S.	2210	Nuevo León	51627
Campeche	7724	Oaxaca	11126
Coahuila	14618	Puebla	9463
Chiapas	6185	Querétaro	9388
D.F.	32885	Quintana Roo	7350
Colima	4103	S.L.P.	7016
Chihuahua	4992	Sinaloa	28974
Durango	2513	Sonora	7716
Guanajuato	22029	Tabasco	16320
Guerrero	15423	Tamaulipas	34034
Hidalgo	4374	Tlaxcala	4392
Jalisco	43101	Veracruz	73260
México	52196	Yucatan	5991
Michoacán	5426	Zacatecas	5708

Un estudio realizado en Cuba demuestra que el empleo combinado de la microscopia directa y el cultivo, ayuda a detectar un mayor número de Dermatofitos. Se encuentra el agente etiologico más proximo o relacionado con estas micosis, la afección clínica más frecuente, las lesiones en más de una región corporal, así como la especie más frecuente. (14)

Para el diagnóstico con examen directo se ha utilizado también una preparacion que da brillo a las telas, el blanco de calcoflúor, con el fin de aclarar la preparacion. Esta sustancia se une a la quitina y a la celulosa y muestra una fluorescencia verdosa cuando es expuesta a la luz ultravioleta de onda larga. Es más fácil y rápido interpretar la preparacion blanca de calcoflúor que la laminilla con KOH, pero se requiere de un microscopio de fluorescencia

La precisión en el diagnóstico es casi igual con los dos métodos, pero el blanco de calcoflúor proporciona un número excesivo de lecturas positivas falsas con los raspados de las lesiones causadas por levaduras. Con cualquiera de los metodos debe ser posible distinguir hifas y esporas. (22)

Existe otra técnica confiable para identificar a los dermatofitos mediante el examen directo y cultivo, en donde la muestra se obtiene por raspado de escamas de piel, uñas y pelos, utilizando instrumental estéril. El material córneo se disgrega con KOH al 20 %, seguido de un breve calentamiento en el mechero de Bunsen. Se tiñe con Rodamina y se observa al microscopio. Las muestras fueron cultivadas en medio de agar Sabouraud glucosado al 2% con Cloranfenicol o gentamicina a razón de 100 mg / litro de medio en duplicado. Los cultivos se incubaron a 37° C hasta por 30 días. La identificación del hongo se realizo con base en la observacion macroscópica de la colonia y su observación morfológica microscópica

Por lo que se afirma el alto rendimiento del examen directo (97,2 %), este método sencillo de realizar, de bajo costo y que se efectúa en el momento de la consulta, confirma un diagnóstico para iniciar tratamiento (6)

## DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS DERMATOFITOS.

En las estadísticas reportadas por el INDRE en 1993, en el Edo. de México y el D.F. reportaron 85081 casos de dermatomicosis y dermatofitosis. los numeros de casos se anexan en la siguiente tabla (10)

<b>CUADRO 4</b>			
<b>NÚMERO DE CASOS TOTAL DE DERMATOFITOSIS Y DERMATOMICOSIS.</b>			
Estado	Número	Estado	Número
Aguascalientes	3794	Morelos	13722
B.C.N.	8272	Nayarit	8364
B.C.S.	2210	Nuevo León	51627
Campeche	7724	Oaxaca	11126
Coahuila	14618	Puebla	9463
Chiapas	6185	Querétaro	9388
D.F.	32885	Quintana Roo	7350
Colima	4103	S.L.P.	7016
Chihuahua	4992	Sinaloa	28974
Durango	2513	Sonora	7716
Guanajuato	22029	Tabasco	16320
Guerrero	15423	Tamaulipas	34034
Hidalgo	4374	Tlaxcala	4392
Jalisco	43101	Veracruz	73260
México	52196	Yucatan	5991
Michoacán	5426	Zacatecas	5708

Según Arenas en su edición de 1993, los datos más recientes recopilados, son micosis cosmopolitas que predominan en zonas tropicales. Se consideran las más frecuentes de las enfermedades por hongos. En México se observa entre los diez primeros lugares de consulta dermatológica. Afecta a sujetos de cualquier raza, edad o sexo así como de cualquier medio socioeconómico u ocupación

En México se observa una distribución de los dermatofitos de la siguiente manera

- *T. rubrum*. 36 - 52%.
- *T. mentagrophytes* 5 - 8%
- *E. floccosum* 3 - 8%.
- *T. tonsurans* 15 - 28%
- *M. canis* 14 - 24% ocasionando el 40% de las tiñas de la cabeza. ( 11 )

Sin embargo en un artículo publicado por la revista del centro dermatológico Pascua en los meses de Mayo a Agosto de 1993, manifiesta que el 1.9% de personas que acuden al servicio de micología es debido a micosis, teniendo una incidencia los siguientes dermatofitos

- *T. rubrum* 61 1%.
- *M. canis* 23 7%.
- *T. tonsurans* 7.2%
- *E. floccosum* 4 9%
- *T. mentagrophytes* 3 2%
- *M. gypseum* 0.8%. ( 12 )

Mientras que en un artículo de la revista Mycosis publicado en 1994, manifiesta que las micosis en México causadas por dermatofitos va cambiando constantemente con el paso del tiempo así como va variando la frecuencia de los agentes causantes de las dermatofitosis, como lo muestra el siguiente cuadro:

- *T. rubrum* 80 9%.
- *T. mentagrophytes* 9 0%.
- *M. canis* 5 3%
- *T. tonsurans* 2 8%.
- *E. floccosum* 2.0%

Las variaciones observadas en los agentes etiológicos y formas clínicas de las dermatofitosis en México durante los últimos 20 años, reflejan la gran capacidad de adaptación de *T. rubrum* a las condiciones del huésped, razón por la cual sigue siendo el de mayor incidencia. (16)

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría (Reportado en 1997) en 130 niños de ambos sexos de edades entre 5 meses y 18 años. se aislaron los siguientes dermatofitos, de lesiones de diferente localización. ( 3 )

Dermatofitos aislados		Localización de lesiones	
<i>M. canis</i>	54.88%	Tiña de la cabeza	42 10%
<i>T. rubrum</i>	19.54%	Tiña del cuerpo	32 33%
<i>T. tonsurans</i>	15.0%	Uñas de pies	10 52%
<i>T. mentagrophytes</i>	9.02%	Ingles	1.5%
<i>E. floccosum</i>	1.5%	Uñas de manos	1 5%
		Manos	0 75%

En un estudio realizado en CUBA en el año de 1991 se encontró Dermatofitos aislados según la localización de la lesión (14)

DERMATOFITOS	Localización de la Lesión							
	Especies	No.	%	Cabeza	Pies	Manos	Uñas	Ingle
<i>Trichophyton rubrum</i>	64	70.3	0	26	16	11	5	6
<i>Epidermophyton floccosum</i>	12	13.2	0	8	2	0	1	1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9	9.9	0	7	0	1	0	1
<i>Microsporum gypseum</i>	3	3.3	2	0	0	0	0	1
<i>Microsporum canis</i>	1	1.1	1	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	1.1	1	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton soudanense</i>	1	1.1	1	0	0	0	0	0
TOTAL	91		5	41	18	12	6	9

## CARACTERÍSTICAS ESPECIFICAS PARA FAVORECER LA CONIDIACIÓN DE ALGUNOS DERMATOFITOS.

Nimi et al demostraron que la producción de macroconidias de *T. mentagrophytes* se realiza mejor en agar glucosa Sabouraud (AGS) suplementado con NaCl, el cual facilita la formación de abundantes macroconidias (29)

Ademas se sabe que factores nutricionales y ambientales influyen en los procesos de germinación de macroconidias con implicaciones biológicas y clínicas.

Las microconidias se obtuvieron por crecimiento del hongo en agar glucosa Sabouraud durante 2 semanas a 25°C. Se tomó como criterio para considerar la capacidad de germinación una macroconidia con al menos un compartimento germinado.

El proceso de desarrollo de macroconidias de *T. mentagrophytes* en AGS - NaCl se observó por SEM (microscopía electrónica de barrido). De 3 a 5 días de cultivo, las macroconidias jóvenes se desarrollan como ramas cortas a los lados de la hifa o como un bulto en la extremidad de la hifa. Después de una semana de incubación las macroconidias se observan septadas con 3 o mas compartimentos, en forma de aguja y de superficie lisa

Las paredes septadas tienen su inicio en un estado temprano de la producción de macroconidias, el número de paredes septadas por conidias aumenta con el tiempo de incubación. Las macroconidias con 3 septos fueron las más comunes

Después de dos semanas de incubación, la capa rica en macroconidias fue cubierta por una nueva materia micelial. Esta hifa secundaria no producía ninguna macroconidia. En los cultivos viejos de un mes, las paredes de las macroconidias tenían una rotura central y los compartimentos se volvían esféricos. La incubación dió como resultado la separación de los compartimentos de la macroconidia, los cuales lucían como clamidiosporas

En un estudio realizado en CUBA en el año de 1991 se encontró Dermatofitos aislados según la localización de la lesión (14)

DERMATOFITOS	Localización de la Lesión							
	Especies	No.	%	Cabeza	Pies	Manos	Uñas	Ingle
<i>Trichophyton rubrum</i>	64	70.3	0	26	16	11	5	6
<i>Epidermophyton floccosum</i>	12	13.2	0	8	2	0	1	1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9	9.9	0	7	0	1	0	1
<i>Microsporum gypseum</i>	3	3.3	2	0	0	0	0	1
<i>Microsporum canis</i>	1	1.1	1	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	1.1	1	0	0	0	0	0
<i>Trichophyton soudanense</i>	1	1.1	1	0	0	0	0	0
TOTAL	91		5	41	18	12	6	9

## CARACTERÍSTICAS ESPECIFICAS PARA FAVORECER LA CONIDIACIÓN DE ALGUNOS DERMATOFITOS.

Niimi et al. demostraron que la producción de macroconidias de *T. mentagrophytes* se realiza mejor en agar glucosa Sabouraud (AGS) suplementado con NaCl, el cual facilita la formación de abundantes macroconidias (29)

Además se sabe que factores nutricionales y ambientales influyen en los procesos de germinación de macroconidias con implicaciones biológicas y clínicas

Las microconidias se obtuvieron por crecimiento del hongo en agar glucosa Sabouraud durante 2 semanas a 25°C. Se tomó como criterio para considerar la capacidad de germinación una macroconidia con al menos un compartimento germinado.

El proceso de desarrollo de macroconidias de *T. mentagrophytes* en AGS - NaCl se observó por SEM (microscopía electrónica de barrido). De 3 a 5 días de cultivo, las macroconidias jóvenes se desarrollan como ramas cortas a los lados de la hifa o como un bulto en la extremidad de la hifa. Después de una semana de incubación las macroconidias se observan septadas con 3 o más compartimentos, en forma de aguja y de superficie lisa.

Las paredes septadas tienen su inicio en un estado temprano de la producción de macroconidias, el número de paredes septadas por conidias aumenta con el tiempo de incubación. Las macroconidias con 3 septos fueron las más comunes.

Después de dos semanas de incubación, la capa rica en macroconidias fue cubierta por una nueva materia micelial. Esta hifa secundaria no producía ninguna macroconidia. En los cultivos viejos de un mes, las paredes de las macroconidias tenían una rotura central y los compartimentos se volvían esféricos. La incubación dio como resultado la separación de los compartimentos de la macroconidia, los cuales lucían como clamidiosporas

Se estudio la relación entre la edad conidial y el potencial de germinación. Las macroconidias obtenidas de cultivos de dos meses o cultivos jóvenes germinan bien, pero el grado de germinación disminuye cuando el periodo es mayor a 4 meses.

Hay una diferencia en la temperatura óptima para la germinación de macroconidias entre *T. mentagrophytes* y *Microsporium gypseum*; 37°C para el primero y 18-25°C para el último. *Trichophyton mentagrophytes* requiere varios nutrientes y pretratamientos para la germinación. La macroconidia de *M. gypseum* al contrario, germinó en agua destilada o salina sin activación especial. (29)

En las macroconidias polimorfas de *Microsporium canis* obtenidas de pacientes y cultivadas en agar glucosa Sabouraud, presentó crecimiento rapido, ligeramente amarillo en el envase con un borde plumoso, superficie aterciopelada, con pliegues radiales y micelio esparcido. Bajo la luz de la lámpara de Wood da una débil fluorescencia roja.

Microscópicamente se encontraron hifas septadas, micelio en raqueta y espirales en colonias viejas. Abundantes macroconidias en forma de huso de pared gruesa y rugosa, con protuberancia apical. También se encuentran formas distorsionadas y bizarras, bifurcadas, elongadas y lisas con constricciones centrales, formas bizarras largas y delgadas parecidas a raíces y algunas que parecen vacías con invasión de la hifa. La mayoría de las macroconidias desarrollan protuberancias, apéndices o burbujas. Sólo se observaron pequeñas microconidias cilíndricas y clamidiosporas en cultivos viejos (8)

Los resultados que obtuvieron Akin et al. sobre el estudio del tiempo monitoreado para el desarrollo de macroconidias por microscopia electrónica de barrido (SEM), reveló el tiempo aproximado para la formación de macroconidias y también de ornamentaciones macroconidiales. La macroconidia se desarrolló por primera vez a las 5 hrs. Después de aparecer la hifa inicial y sin ornamentaciones superficiales. No se observaron cambios en la conidiación durante las 6 hrs. de desarrollo. Sin embargo después de 7 hrs unas pocas macroconidias poseían una rugosidad en la pared celular pero la mayoría permanecían lisas. Después de 8 hrs. La macroconidia tenía una ornamentación rugosa, rodeando en ambas direcciones a la que se llamo "Pólipos"

Se confirmó que el proceso inicial en la conidiación es el alargamiento de la hifa final. El hinchamiento fue liso, no septado, fusiforme y sólo después apareció el cruce de paredes. Los primeros dos septos tendidos hacia abajo fueron submediales en la superficie y regiones bajas de la espora. El tercer septo se formó entre la superficie, submedio cruzó pared y apice final de la espora.

De los resultados del trabajo de Akin se obtienen la siguiente conclusión:

La morfología de macroconidias que se producen abundantemente bajo condiciones adecuadas in vitro (principalmente producidas por los géneros *Microsporium* y *Epidermophyton*), provee un útil criterio para clasificar a los dermatofitos. La naturaleza rugosa de la pared celular de macroconidias de *Microsporium spp* Constituye uno de los principales criterios para la diferenciación del género. (2)

La conidia rugosa de *M. gypseum* es una característica estable la cual es producida durante el crecimiento en varios de los medios de cultivo ordinarios

Las preparaciones fijas y no fijas revelaron que la naturaleza rugosa de la macroconidia de *M. gypseum* consiste de numerosas proyecciones redondas extendidas en la pared celular y unidas a ella un tallo. El termino pólipos es sugerido como el nombre apropiado para estas proyecciones en la pared de *M. gypseum*

Bajo las condiciones de cultivo empleadas en ese estudio, las primeras esporas se observaron después de 4 a 5 hrs. Después de aparecer la hifa en el agar y los pólipos emergieron de 2 o 3 hrs. Después de la formación de la espora. (2)

En otro trabajo realizado por Mavroudeas et al., relacionado con el proceso de conidiación, se probó el uso de medios de cultivo modificado y su efecto en la esporulación de ambos grupos de dermatofitos (frescos y almacenados) y con base a esto, se inicia un mapa epidemiológico de dermatofitos. En este trabajo se presentaron datos colectados de dermatofitos antropofílicos y zoofílicos, comparando la morfología de aislados frescos con los desarrollados después de almacenar a 4°C durante 8 semanas

El énfasis fue determinar la presencia o ausencia de macroconidias en muestras aisladas frescas e inoculadas en agar glucosa Sabouraud con modificaciones

Lo que se concluyó con los cultivos modificados fue que subcultivos en agar glucosa Sabouraud (AGS) conteniendo cicloheximida, y el almacenaje a 4°C, causa progresivamente inusuales macroconidias, particularmente ciertos aislados disgónicos y aconidiales de *M. canis*. Sin embargo, esta puede ser una propiedad innata de los dermatofitos, estos resultados indican reversibilidad de fenotipos disgónicos o atípicos debido a factores exógenos como nutrición y condiciones ambientales; resultando en la reactivación de formación de macroconidias. La producción de macroconidias en los aislados correlaciona bien con la disminución en la concentración de glucosa en el medio. En concentraciones reducida de glucosa de 5 y 10g/l en AGS induce la formación de macroconidias en *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* y *E. floccosum*, en aislados frescos y almacenados. Esto refuerza el argumento de varios autores, de que la formación de macroconidias es activada en condiciones adversas (28)

*Trichophyton rubrum* mostró una producción rica de macroconidias en presencia de 0,6g/l de tiamina. La producción de macroconidias de *T. verrucosum* fue facilitada por una concentración de 5g/l de glucosa y 0,6g/l de tiamina.

La mejor calidad y cantidad de macroconidias típicas de *M. canis* (aislado fresco y almacenado) se observó en AGS suplementado con 0,6g/l de tiamina. Las concentraciones de tiamina menores y mayores a 0,6g/l tienen poco o ningún efecto en la morfología o número de macroconidias. Se observaron resultados similares en esta concentración típica de tiamina en aislados de *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. rubrum* y *E. floccosum* (28)

Un estudio realizado por Ajello sobre el cultivo de *T. soudanense* permitió la observación de macroconidias cuando este crece en agar Lactrimel de Borelli. Donde se buscó el efecto del agar Lactrimel y otros medios en la producción inicial de macroconidias en otros aislados de *T. soudanense* con buenos resultados (1)

La diferenciación de varias especies de *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Trichophyton* está basada principalmente en la morfología de su macroconidia holotática y en el caso de *E. floccosum*, la ausencia de microconidias. Muchas especies del género *Microsporium* (*M. audouinii*, *M. ferrugineum*) y *Trichophyton* (*T. concentricum*, *T. schoenleini*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. verrucosum* y *T. yaoundei*), no producen macroconidias fácilmente, en los medios micológicos de rutina.

El agar Lactrimel de Borelli es recomendado como medio de esporulación para especies de *Microsporium* y *Trichophyton* que fallan en la esporulación en medios micológicos de rutina (1)

Otro trabajo realizado por Simon y Galgoczy demostró que otra estructura importante son las clamidiosporas que presentan los dermatofitos, una clamidiospora es una conidia holotática de desarrollo terminal, lateral o intercalar. Durante el proceso de su maduración la pared celular delgada y el citoplasma se vuelve más denso y redondo. Una clamidiospora es liberada por la desintegración de células circundantes. Son conidias de resistencia o supervivencia de acuerdo a esta función (36)

En este trabajo encontraron que la mayoría de las colonias de especies de *Trichophyton* (*T. violaceum* y *T. verrucosum*) y de *M. ferrugineum* están compuestas de clamidiosporas en cadenas. Lo mismo puede ser visto con hifas de *E. floccosum*, rodeando la superficie del medio. La mayoría de las cadenas de clamidiosporas están en la superficie del medio en cultivos jóvenes. (36)

La hifa especial aparece simultáneamente con el desarrollo de clamidiosporas en cadena en la superficie del agar. Su forma es parecida a salchichas y son más delgadas de lo normal. Estas estructuras pueden convertirse en cadenas de clamidiosporas en el transcurso del desarrollo, por lo que se llamaron hifas preclamidiosporas.

Se observaron clamidiosporas biceluladas y macroconidias originadas de clamidiosporas. Se observó también su gemación multilateral.

Con el transcurso del tiempo una parte de las protuberancias de las hifas en raqueta se transformó en clamidiosporas.



En contraste a otros *órganos accesorios*, las raquetas tienden a conectarse a las clamidiosporas en lugar de separarse. Estas son el estado inicial del desarrollo de clamidiosporas.

Las clamidiosporas pueden diferenciarse de estructuras superficiales similares.

Las clamidiosporas aparecen abundantemente en cultivos jóvenes. Las cadenas de clamidiosporas se observaron desde el exterior de las hifas vegetativas. (36)

Se ha encontrado que *Microsporium canis* es una causa común de dermatofitosis zoofílica en el hombre y es adquirida de gatos y perros. Se han descrito diversas variantes de la especie y algunas de estas han sido denominadas disgónicas o cepas lisas. Estas cepas han sido asociadas con brotes infecciosos, los cuales muestran expansiones progresivas y en algunos sitios las cepas disgónicas predominan sobre las cepas típicas.

La forma disgónica de *M. canis* ha sido descrita como colonias que inicialmente son de color amarillo - pálido gruesa y umbonada en el centro con una periferia marcadamente plumosa, la cual está casi enteramente sumergida en el medio y en forma estrellada. Las colonias viejas adquieren un aspecto cerebriforme y son de color rosado a café con una superficie parecida a la gomosa. Algunos de estos aislados son inestables y revierten a la forma típica de las especies por sectores, inmediatamente o después de varios subcultivos. Hay una tercera forma de crecimiento llamada "Atípica". La apariencia microscópica de la cepa disgónica es muy distintiva. El micelio está compuesto de hifas gruesas y muy cortas con ramificaciones laterales o reflexivas. Las macroconidias y microconidias no están presentes en la fase disgónica de *M. canis*, pero pueden estar presentes macroconidias deformes cuando ellas cambian al estado atípico. La presencia de estas macroconidias deformes ha resaltado algunas cuestiones sobre la relación taxonómica entre *M. canis* y *Microsporium distortum*. (35)

Con respecto a *Trichophyton tonsurans* es uno de los agentes etiológicos frecuentes de la tinea capitis y en menor grado de tinea corporis en Estados Unidos de Norte América. Su morfología colonial y microscópica es altamente variable, históricamente se propusieron 43 binomios para ser sinónimos de *T. tonsurans*, reflejando con esto su variación morfológica. (31)

Tipicamente *T. tonsurans* produce más microconidias que macroconidias, las cuales entre ellas varían en tamaño y forma. Cuando se producen macroconidias, estas son de apariencia cilíndrica, en forma de clava, de pared delgada y lisa, multicelulares o irregulares y generalmente tienden a ser abortivas. Las macroconidias son generalmente raras pero pueden ser producidas en gran número en agar Wort (Difco, U.S.A.) (31, 39)

Debido a la variación que presente este dermatofito, las pruebas basadas en estimulación de crecimiento con tramina fueron sugeridas como una vía en la identificación de cepas morfológicamente atípicas. En la mayoría de las especies de dermatofitos, la habilidad para perforar pelo in vitro es una característica específica de especies y es usado como un accesorio para diagnóstico. Los aislados de *T. tonsurans* var. *sulfureum* representan la única excepción, porque ellos entran en los dos grupos: perforadores y no perforadores. (31)

Las especies pertenecientes al género *Microsporium* típicamente producen macroconidias de pared rugosa y microconidias de pared lisa. Sin embargo, se han reportado macroconidias de pared lisa producidas por aislados de *Microsporium gypseum*; esto ocurrió en otras especies de *Microsporium*, tales como *M. persicolor* y *M. gallinae*. Desde la clasificación de los 3 géneros anamórficos de los dermatofitos por Emmons en 1934, estas rígidas distinciones morfológicas tienden a ser morfológicamente continuas, basándose en el traslape de las características. La artificialidad de estas distinciones es además demostrada por estudios moleculares, los cuales confirman la propuesta de que los géneros teleomórficos *Arthroderma* (anamórfico especie *Trichophyton* y algunas especies de *Chrysosporium*) y *Nannizzia* (anamórfico especie *Microsporium*) son congénicos, con *Arthroderma*, teniendo prioridad sobre *Nannizzia*. Aunque la relación filogenética de *Epidermophyton* es aun desconocida, los estudios moleculares futuros pueden demostrar su cerrada relación con *Arthroderma*. (27, 31)

Smith J.M.B. y Rush - Munro F.M. encontraron que algunos dermatofitos tienen características variables y existen en un número de variedades morfológicas distintas bajo condiciones normales de cultivo. Dos de esas especies son *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Generalmente cepas de *T. rubrum* muestran un número de características, de las cuales las más importantes son, la producción de un color rojo oscuro bajo la colonia ( tallo ) en glucosa peptona , pero no en agar peptona (una rara variante es caracterizada por la producción de un pigmento melanoide café oscuro difundido en agar peptona y glucosa peptona); un pigmento rojo vino difuso en agar papa dextrosa o similares, de impedimento de utilizar urea en 5-6 días, la imposibilidad de perforar cabello in vitro, la habilidad de crecer en un simple y basal medio ácido y la formación de finas macroconidias con forma de lápiz (microaleurosporas)

La recuperación de una cepa de *T. rubrum* con producción de un pigmento inusual y propiedades microscópicas y un requerimiento nutricional al ácido nicotínico, podría ser de interés. ( 37 )

## OBJETIVOS GENERALES.

1. Encontrar el tiempo óptimo de conidiación
2. Mantener el cepario y un museo de hongos dermatofitos en el laboratorio de Producción de Campus - I FES Zaragoza
3. Encontrar la técnica óptima de tinción.
4. Encontrar la técnica óptima de microcultivo ( medios de cultivo para favorecer la conidiación) y de preparaciones fijas, para los dermatofitos que se encuentra en el cepario.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Implementar el manual de procedimientos para la obtencion del tiempo de conidiación de los dermatofitos que se encuentra en el cepario del laboratorio de Producción de Campus - I FES Zaragoza
2. Probar y afinar la técnica de tinción de Azul de Anilina Lactofenol Modificado.
3. Afinar la técnicas de microcultivo con diversos medios de cultivo.
4. Afinar la técnicas de preparaciones fijas.
5. Dar seguimiento y mantenimiento del cepario de dermatofitos que se encuentra en el laboratorio de Produccion de la FES Zaragoza
6. Generare material de apoyo de dermatofitos para las áreas afines, para los módulos que manejan hongos (MG-II, Biología Medica, Agresión y Defensa I y Microbiología para la carrera de Medicina 1° y 2° año), como los son diaporamas, preparaciones fijas, cultivos, microfotografías, etc.

## HIPÓTESIS.

1. Se espera encontrar los tiempos óptimos de conidiación de los trece dermatofitos que se encuentra en el laboratorio de Producción de la FES-Z, implementando la técnica óptima de microcultivo, de tinción y el tiempo optimo de crecimiento mediante el control de la temperatura de incubación
2. Se espera encontrar la técnica óptima de tinción ( ajustando la concentracion de colorante y tiempo de exposicion del mismo en las preparaciones ) y microcultivo (usando medios de cultivo para favorecer la conidiacion, asi como controlando la temperatura y el tiempo de crecimiento óptimo) y de preparaciones fijas ( estandarizando la cantidad de resina adicionada en la preparacion ).

## **OBJETIVOS GENERALES.**

1. Encontrar el tiempo óptimo de conidiación
2. Mantener el cepario y un museo de hongos dermatofitos en el laboratorio de Producción de Campus - I FES Zaragoza
3. Encontrar la técnica óptima de tinción
4. Encontrar la técnica óptima de microcultivo ( medios de cultivo para favorecer la conidiación) y de preparaciones fijas, para los dermatofitos que se encuentra en el cepario

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Implementar el manual de procedimientos para la obtención del tiempo de conidiación de los dermatofitos que se encuentra en el cepario del laboratorio de Producción de Campus - I FES Zaragoza.
2. Probar y afinar la técnica de tinción de Azul de Anilina Lactofenol Modificado
3. Afinar las técnicas de microcultivo con diversos medios de cultivo
4. Afinar las técnicas de preparaciones fijas.
5. Dar seguimiento y mantenimiento del cepario de dermatofitos que se encuentra en el laboratorio de Producción de la FES Zaragoza
6. Generare material de apoyo de dermatofitos para las áreas afines, para los módulos que manejan hongos (MG-II, Biología Medica, Agresión y Defensa I y Microbiología para la carrera de Medicina 1° y 2° año), como los son diaporamas, preparaciones fijas, cultivos, microfotografías, etc

## **HIPÓTESIS.**

1. Se espera encontrar los tiempos óptimos de conidiación de los trece dermatofitos que se encuentra en el laboratorio de Producción de la FES-Z, implementando la tecnica óptima de microcultivo, de tinción y el tiempo optimo de crecimiento mediante el control de la temperatura de incubación
2. Se espera encontrar la técnica óptima de tinción ( ajustando la concentración de colorante y tiempo de exposición del mismo en las preparaciones ) y microcultivo (usando medios de cultivo para favorecer la conidiación, así como controlando la temperatura y el tiempo de crecimiento óptimo) y de preparaciones fijas ( estandarizando la cantidad de resina adicionada en la preparación )

## **OBJETIVOS GENERALES.**

1. Encontrar el tiempo óptimo de conidiación
2. *Mantener el cepario y un museo de hongos dermatofitos en el laboratorio de Producción de Campus - I FES Zaragoza*
3. Encontrar la técnica óptima de tinción.
4. Encontrar la técnica óptima de microcultivo ( medios de cultivo para favorecer la conidiación) y de preparaciones fijas, para los dermatofitos que se encuentra en el cepario.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Implementar el manual de procedimientos para la obtencion del tiempo de conidiación de los dermatofitos que se encuentra en el cepario del laboratorio de Producción de Campus - I FES Zaragoza
2. Probar y afinar la técnica de tinción de Azul de Anilina Lactofenol Modificado
3. Afinar las técnicas de microcultivo con diversos medios de cultivo
4. Afinar las técnicas de preparaciones fijas.
5. Dar seguimiento y mantenimiento del cepario de dermatofitos que se encuentra en el laboratorio de Producción de la FES Zaragoza
6. Generare material de apoyo de dermatofitos para las áreas afines, para los módulos que manejan hongos (MG-II, Biología Medica, Agresión y Defensa I y Microbiología para la carrera de Medicina 1º y 2º año), como los son diaporamas, preparaciones fijas, cultivos, microfotografías, etc.

## **HIPÓTESIS.**

1. Se espera encontrar los tiempos óptimos de conidiación de los trece dermatofitos que se encuentra en el laboratorio de Producción de la FES-Z, implementando la técnica óptima de microcultivo, de tinción y el tiempo óptimo de crecimiento mediante el control de la temperatura de incubacion
2. Se espera encontrar la técnica óptima de tinción ( ajustando la concentración de colorante y tiempo de exposición del mismo en las preparaciones ) y microcultivo (usando medios de cultivo para favorecer la conidiación, así como controlando la temperatura y el tiempo de crecimiento óptimo) y de preparaciones fijas ( estandarizando la cantidad de resina adicionada en la preparacion )

## MATERIAL

### MATERIAL

- Asas micológicas
- Asas bacteriológicas
- Bolsas de plástico calibre 200 y 300
- Bisturios
- Cajas petri marca PIREX o KIMAX de 100 X 15 MM
- Cubrebocas
- Cubreobjetos
- Mecheros Fisher
- Mecheros Bunssen
- Lámparas de L U V.
- Estantería
- Gasas
- Pinzas
- Guantes
- Portaobjetos
- Varillas en "V"
- Tubos de ensayo con tapa de rosca de baquelita de 18X150
- Tubos de ensayo con tapa de rosca de baquelita de 13X100
- Tubos de ensayo sin tapa de 18X100
- Tubos de ensayo sin tapa de 13X100
- Matraces de Erlenmeyer de 300, 500 y 1000 ml.
- Pipetas de 1, 5, 10 ml

### CANTIDAD

- 10 pzas
- 2 pzas
- 1 Kg de c/u
- 3 pzas
- 200 pzas.
- 1 paquete
- 20 cajas
- 4 pzas
- 2 pzas
- 3 pzas
- 4 pzas (250X100 cm)
- 1 paquete
- 5 pzas
- 10 pares
- 20 cajas
- 100 pzas
- 3 cajas de 100 pzas
- 3 cajas de 100 pzas
- 3 cajas de 100 pzas
- 3 cajas de 100 pzas
- 10 pzas de c/u
- 10 de c/u

## MATERIAL BIOLÓGICO

- Trichophyton mentagrophytes \*
- Trichophyton soudanense
- Trichophyton schoenleutii
- Trichophyton tonsurans \*
- Trichophyton terrestre
- Trichophyton rubrum \*
- Trichophyton violaceum
- Trichophyton verrucosum
- Microsporium fulvum
- Microsporium gypseum \*
- Microsporium canis \*
- Microsporium nanum
- Epidermophyton floccosum \*

NOTA: \* Todos estos microorganismos se aislaron de pacientes del Centro Dermatológico Pascua y tipificaron mediante crecimiento en tubos, cajas y microcultivos hasta obtener cepas puras de acuerdo a la literatura de Micología consultada. Mientras que las cepas restantes se obtuvieron del Laboratorio de Producción de la F.E.S. ZARAGOZA, provenientes del Departamento de Micología de la Facultad de Medicina ( U.N.A.M ) (16)

## EQUIPO

- 1 Autoclave marca "AESA", modelo CV-250, voltaje 127 VCA, ciclos 60, Hecho en México, NOM-1-10644.
- Balanza granataria marca OHAUS, capacidad 2610 gr.
- Microscopio óptico marca Carl Zeiss
- 1 Refrigerador marca AMERICAN tipo RC, modelo RC 300
- 1 Placa de calentamiento con agitación marca LINDBERG modelo 53166, watts 530, volts 127
- 1 Horno marca DGESIC, modelo HS, volts 127, ciclos 50/60
- 1 Incubadora marca RIOSA, modelo EC, serie ECME, volts 127, amp. 121-A, ciclos 60/70, temperatura a 37°C
- 1 Campana de extracción marca SQUARE Hecho en México, clase 2510, tipo FG1, pero idealmente
- 1 Campana de flujo laminar marca Purifix Clean Bench, modelo LABCONCO.

## REACTIVOS

### REACTIVOS.

### CANTIDAD

1. Acido Lactico Baker.	1 l	85 - 90 %
2. Glicenna Baker	1 l	99.8 %
3. Alcohol Puro de Caña. Alcomex	20 l	
4. Xilol Baker.	1 l	
5. Azul de Anilina Lactofenol. Sigma	100 g	
6. Fenol Técnica Química.	10 l	
7. Leche Descremada en Polvo Nestle Svelty.	360 g	
8. Harina de trigo	250 g	
9. Miel de Abeja Carlota	300 g	
10. Resina Sintetica Sigma al 60 % en Xilol	1 l	

## MEDIOS DE CULTIVO

### ESPECIFICACIONES

### CANTIDAD

1. Agar Dextrosa de Sabouraud . Bioxon	450 g
2. Agar Bacteriológico Bioxon	450 g

## MEDIOS DE CULTIVO.

### FORMA DE PREPARACIÓN:

#### Agar Dextrosa Sabouraud ( Sabouraud Simple )

Es un medio utilizado para el aislamiento, identificación y mantenimiento de la gran mayoría de los hongos patógenos. Su composición es la siguiente:

##### Composición

- Peptona 10 gr
- Glucosa 20 gr
- Agar - agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml

##### Procedimiento:

- 1 Disuelva los ingredientes en el agua.
- 2 Se deja reposar durante 10 minutos
- 3 Ajuste el pH a 5.6.
- 4 Se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C.

Para obtener el medio líquido, deberá de prescindirse del agar

#### Agar Dextrosa Sabouraud ( Comercial )

- Agar Dextrosa Sabouraud 65 gr
- Agar Bacteriológico 2 gr
- Agua Destilada 1000 ml

\* Seguir el mismo procedimiento anterior para su preparación

## MEDIOS QUE FAVORECEN LA CONIDIACIÓN.

#### Medio de Cultivo de Borelli ( Lactrimel ).

##### Composición:

Harina de trigo	14 g
Leche Descremada en polvo	14 g
Miel de abeja	7 g
Agar	14 g
Agua destilada	1000 ml

##### Procedimiento:

- 1 Disolver todos los ingredientes en el agua destilada.
2. Esterilizar en autoclave 15 min. a 15lb. de presión.

#### Agar Lactrimel (modificado)

##### INGREDIENTES

Leche descremada	200 ml
Cereal de Trigo y Miel (Gerber)	20 g
Agar	20 g
Agua	800 ml



**Procedimiento:** Mezclar la harina y el agua y agitar hasta que la harina esté bien distribuida y libre de grumos. Calentar en baño de agua a 60°C durante 20 minutos. Filtrar a través de varias capas de algodón. Adicionar todos los ingredientes y poner en autoclave a 121°C por 15 minutos. Dispensar en cajas petri o tubos.

## TÉCNICA DE MICROCULTIVO, TINCIÓN Y MONTAJE.

### Técnica tradicional

1. En la base de una caja de petri de 10 cm de diámetro se coloca una varilla de vidrio doblada en forma de "V" (caballete)
2. Sobre la varilla se fija el portaobjetos de 76 X 22 mm., con ayuda de cinta adhesiva. Se deposita en la misma caja un Cubreobjetos de 24 X 24 mm
3. Se esteriliza el material durante 15 minutos a 15 libras de presión
4. Se prepara una caja de petri con el medio seleccionado de aproximadamente 5 mm de espesor
5. Se corta el medio en círculos de 1.5-2 cm de diámetro X 1 cm de alto con ayuda de un tubo estéril
6. Se coloca un cuadro del medio de cultivo en el centro del portaobjetos de la caja de petri.
7. Se inocula en cada uno de los lados del fragmento de medio una pequeña porción del hongo a estudiar
8. Se coloca el cubreobjetos sobre el medio inoculado.
9. Se adiciona a la caja 10 ml. de glicerina al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo
10. Se incuba en la oscuridad durante 7 a 15 días a 25 °C.
11. Se inactiva el microcultivo con Fenol al 10 %, dejándolo como mínimo 2 hrs.
12. Se retira el cubreobjetos y se coloca sobre el mismo portaobjetos en una de sus orillas laterales limpia.
13. Se retira y desecha el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos, en un recipiente con fenol al 10 %
14. Se cubre tanto el portaobjetos como el cubreobjetos (con muestra) con Azul de Anilina Lactofenol (preparación del colorante en el anexo # 2 ).
15. Se deja reposar durante 48 hrs, cuidando que durante este tiempo el colorante no se seque en la superficie de la laminilla
16. Una vez transcurrido este tiempo se inclina el portaobjetos y el cubreobjetos. para eliminar todo el exceso de colorante; y se limpia con una gasa seca los lugares donde no hubo crecimiento de el hongo cuidando de no dañar el mismo.
17. En caso de querer conservar las preparaciones durante largo tiempo, se hace lo siguiente. Se coloca una gota de resina sobre el centro de la preparación del portaobjetos y se coloca encima un cubreobjetos limpio, cuidando de no producir burbujas en la preparación (preparación de la resina en el anexo # 2 )
18. A un portaobjetos limpio se le agrega una gota de resina y se cubre con el cubreobjetos que tuvo crecimiento, cuidando de no producir burbujas.

**NOTA:** Para preparaciones rápidas solo se tiene que agregar una gota de Azul de Anilina Lactofenol tanto al cubreobjetos y portaobjetos y colocarles su correspondiente portaobjetos y cubreobjetos limpios respectivamente. Y de esta forma se podrá observar inmediatamente al microscopio (16)

## DESARROLLO EXPERIMENTAL.

- 1) Elaboración de los medios de cultivo agar glucosa Sabouraud (AGS) y Lactrimel para enriquecimiento de las cepas y observación de las características coloniales; respectivamente.
- 2) Manejar e inocular sus respectivas cajas de petri y tubos de ensaye (en los medios de cultivo de Lactrimel y Sabouraud) las 13 cepas dermatofitos existentes en el Ceparío del Laboratorio de Producción.

<i>T. soudanense</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. verrucosum</i>
<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. violaceum</i>
<i>E. floccosum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. schoenleumi</i>
<i>mentagrophytes</i>	<i>M. nanum</i>	
<i>M. fulvum</i>	<i>T. terrestre</i>	

**Procedimiento:** Mezclar la harina y el agua y agitar hasta que la harina esté bien distribuida y libre de grumos. Calentar en baño de agua a 60°C durante 20 minutos. Filtrar a través de varias capas de algodón. Adicionar todos los ingredientes y poner en autoclave a 121°C por 15 minutos. Dispensar en cajas petri o tubos.

## TÉCNICA DE MICROCULTIVO, TINCIÓN Y MONTAJE.

### Técnica tradicional

1. En la base de una caja de petri de 10 cm de diámetro se coloca una varilla de vidrio doblada en forma de "V" (caballete)
2. Sobre la varilla se fija el portaobjetos de 76 X 22 mm., con ayuda de cinta adhesiva. Se deposita en la misma caja un Cubreobjetos de 24 X 24 mm.
3. Se esteriliza el material durante 15 minutos a 15 libras de presión.
4. Se prepara una caja de petri con el medio seleccionado de aproximadamente 5 mm de espesor.
5. Se corta el medio en círculos de 1.5-2 cm de diámetro X 1 cm de alto con ayuda de un tubo estéril
6. Se coloca un cuadro del medio de cultivo en el centro del portaobjetos de la caja de petri
7. Se inocula en cada uno de los lados del fragmento de medio una pequeña porción del hongo a estudiar
8. Se coloca el cubreobjetos sobre el medio inoculado
9. Se adiciona a la caja 10 ml. de glicerina al 10%, teniendo cuidado de no mojar el cultivo
10. Se incuba en la oscuridad durante 7 a 15 días a 25 °C
11. Se inactiva el microcultivo con Fenol al 10 %, dejándolo como mínimo 2 hrs
12. Se retira el cubreobjetos y se coloca sobre el mismo portaobjetos en una de sus orillas laterales limpia
13. Se retira y desecha el fragmento de medio de cultivo del portaobjetos, en un recipiente con fenol al 10 %
14. Se cubre tanto el portaobjetos como el cubreobjetos (con muestra) con Azul de Anilina Lactofenol (preparación del colorante en el anexo # 2 ).
15. Se deja reposar durante 48 hrs, cuidando que durante este tiempo el colorante no se seque en la superficie de la laminilla
16. Una vez transcurrido este tiempo se inclina el portaobjetos y el cubreobjetos. para eliminar todo el exceso de colorante; y se limpia con una gasa seca los lugares donde no hubo crecimiento de el hongo cuidando de no dañar el mismo.
17. En caso de querer conservar las preparaciones durante largo tiempo. se hace lo siguiente: Se coloca una gota de resina sobre el centro de la preparación del portaobjetos y se coloca encima un cubreobjetos limpio, cuidando de no producir burbujas en la preparación (preparación de la resina en el anexo # 2 )
18. A un portaobjetos limpio se le agrega una gota de resina y se cubre con el cubreobjetos que tuvo crecimiento, cuidando de no producir burbujas

**NOTA** Para preparaciones rápidas solo se tiene que agregar una gota de Azul de Anilina Lactofenol tanto al cubreobjetos y portaobjetos y colocarles su correspondiente portaobjetos y cubreobjetos limpios respectivamente. Y de esta forma se podrá observar inmediatamente al microscopio (16)

## DESARROLLO EXPERIMENTAL.

- 1) Elaboración de los medios de cultivo agar glucosa Sabouraud (AGS) y Lactrimel para enriquecimiento de las cepas y observación de las características coloniales; respectivamente.
- 2) Manejar e inocular sus respectivas cajas de petri y tubos de ensaye (en los medios de cultivo de Lactrimel y Sabouraud) las 13 cepas dermatofitos existentes en el Cepario del Laboratorio de Producción:

<i>T. soudanense</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. verrucosum</i>
<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. violaceum</i>
<i>E. floccosum</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. schoenleinii</i>
<i>mentagrophytes</i>	<i>M. nanum</i>	
<i>M. fulvum</i>	<i>T. terrestre</i>	

- 3) Observar el crecimiento en tubo y caja en los diferentes medios de cultivo de cada dermatofito
- 4) Tomar fotografías de la morfología colonial de los 13 dermatofitos desde diversos ángulos ( crecimiento en caja con AGS y en tubo de ensaye )
- 5) Realizar la técnica tradicional del microcultivo Preparar 6 cajas con 50 ml de AGS y 6 cajas con 50 ml de agar Lactrimel , dando un grosor de agar de aproximadamente 7 mm
- 6) Realizar 10 microcultivos para cada cepa, en AGS y 10 en agar Lactrimel para obtener el tiempo de crecimiento en ambos medios.
- 7) Determinar el tiempo óptimo de crecimiento en AGS, que se estipuló como el desarrollo micelial abarcando  $\frac{1}{4}$  partes del borde de la superficie del cubreobjetos y portaobjetos inoculado
- 8) Proceder a realizar la técnica de tinción en los portaobjetos y cubreobjetos de los microcultivos por la técnica de Azul de Anilina Lactofenol Modificado ( Anexo 2 )
- 9) Secar, limpiar y fijar las Laminillas con Bálsamo de Canada y observar al microscopio 24 horas despues
- 10) Etiquetar las laminillas especificando.
  - Nombre del dermatofito
  - No. de muestra.
  - Dia de desarrollo y Medio de cultivo
- 11) Determinar el tiempo óptimo de conidiación, mediante la observacion al microscopio ( observación de laminillas en el Microscopio óptico en 10 X, 40 X y 100 X) de las estructuras características de cada dermatofito ( macroconidias, microconidias, tipo de hifas, etc.).
- 12) Identificar el tiempo de desarrollo óptimo de los dermatofito en el microcultivo el cual se realiza mediante la observación al microscopio ( observación de laminillas en el Microscopio óptico en 10 X, 40 X y 100 X) de las estructuras maduras, con mayor cantidad de ellas de las características de cada dermatofito ( macroconidias, microconidias, tipo de hifas, etc )
- 13) De las laminillas que se generaren se elegiran las más representativas por su calidad de tincion, preparación y estructuras características de cada especie
- 14) Las mejores laminillas se elgen para ser fotografiadas en papel y diapositivas en el Fotomicroscopio.

## RESULTADOS

- 1 Se logró modificar la técnica de tinción de Azul de Anilina Lactofenol con un tiempo de exposicion en la preparación de 2 horas a temperatura ambiente ( Anexo 2 ).
- 2 Se optimizó el tiempo de tincion y montaje de las laminillas
- 3 Se ha definido el tiempo óptimo de crecimiento y conidiación en 12 de 13 dermatofitos en agar glucosa Sabouraud, para este fin se utilizó el medio de Borelli que favorece la conidiación de algunas especies como medio de enriquecimiento  
En el aspecto didáctico y aplicable a la docencia se generaron:
  4. 432 preparaciones fijas.
  5. 20 diapositivas de Morfología Colonial desde diversos ángulos de los 13 dermatofitos
  6. 100 diapositivas y 26 Fotografías de Morfología Microscópica tomadas en el fotomicroscopio Olympus a inmersión débil y fuerte, en donde se muestran las característica de las especies de dermatofitos que se encuentran en el cepario
  7. A partir de la actividad experimental se generaron los siguientes datos y gráficas:

- 3) Observar el crecimiento en tubo y caja en los diferentes medios de cultivo de cada dermatofito
- 4) Tomar fotografías de la morfología colonial de los 13 dermatofitos desde diversos ángulos ( crecimiento en caja con AGS y en tubo de ensaye ).
- 5) Realizar la técnica tradicional del microcultivo. Preparar 6 cajas con 50 ml de AGS y 6 cajas con 50 ml de agar Lactrimel , dando un grosor de agar de aproximadamente 7 mm.
- 6) Realizar 10 microcultivos para cada cepa, en AGS y 10 en agar Lactrimel para obtener el tiempo de crecimiento en ambos medios.
- 7) Determinar el tiempo óptimo de crecimiento en AGS, que se estipuló como el desarrollo micelial abarcando  $\frac{1}{4}$  partes del borde de la superficie del cubreobjetos y portaobjetos inoculado.
- 8) Proceder a realizar la técnica de tinción en los portaobjetos y cubreobjetos de los microcultivos por la técnica de Azul de Anilina Lactofenol Modificado ( Anexo 2 ).
- 9) Secar, limpiar y fijar las Laminillas con Bálsamo de Canada y observar al microscopio 24 horas después
- 10) Etiquetar las laminillas especificando
  - Nombre del dermatofito
  - No. de muestra.
  - Día de desarrollo y Medio de cultivo
- 11) Determinar el tiempo óptimo de conidiación, mediante la observación al microscopio ( observación de laminillas en el Microscopio óptico en 10 X, 40 X y 100 X) de las estructuras características de cada dermatofito ( macroconidias, microconidias, tipo de hifas, etc.)
- 12) Identificar el tiempo de desarrollo óptimo de los dermatofito en el microcultivo el cual se realiza mediante la observación al microscopio ( observación de laminillas en el Microscopio óptico en 10 X, 40 X y 100 X) de las estructuras maduras, con mayor cantidad de ellas de las características de cada dermatofito ( macroconidias, microconidias, tipo de hifas, etc.).
- 13) De las laminillas que se generaren se elegiran las más representativas por su calidad de tinción, preparación y estructuras características de cada especie
- 14) Las mejores laminillas se eligen para ser fotografiadas en papel y diapositivas en el Fotomicroscopio.

## RESULTADOS

- 1 Se logró modificar la técnica de tinción de Azul de Anilina Lactofenol con un tiempo de exposición en la preparación de 2 horas a temperatura ambiente ( Anexo 2 )
- 2 Se optimizó el tiempo de tinción y montaje de las laminillas
- 3 Se ha definido el tiempo óptimo de crecimiento y conidiación en 12 de 13 dermatofitos en agar glucosa Sabouraud, para este fin se utilizó el medio de Borelli que favorece la conidiación de algunas especies como medio de enriquecimiento.  
En el aspecto didáctico y aplicable a la docencia se generaron
4. 432 preparaciones fijas.
5. 20 diapositivas de Morfología Colonial desde diversos ángulos de los 13 dermatofitos
6. 100 diapositivas y 26 Fotografías de Morfología Microscópica tomadas en el fotomicroscopio Olympus a inmersión débil y fuerte, en donde se muestran las característica de las especies de dermatofitos que se encuentran en el cepario
7. A partir de la actividad experimental se generaron los siguientes datos y gráficas.

CON BASE EN LOS RESULTADOS SE ARMO EL SIGUIENTE CUADRO DE LA MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA DE LOS DERMATOFITOS UTILIZADOS EN AGAR GLUCOSA SABOURAUD.

	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
<u><i>Epidermophyton floccosum</i></u>	Colonia blanca a crema, con micelio aterciopelado, borde vellosos con surcos radianes. Reverso de color crema.	Macroconidias en forma de mazo de pared delgada y multitabecadas en racimos
<u><i>Microsporium canis</i></u>	Colonias blancas a amarillas, con micelio aterciopelado, de color ante en el centro. Borde vellosos/ plumoso. Reverso de color amarillo - café	Macroconidias espiculadas de pared gruesa, fusiforme, con 8-12 septos.
<u><i>Microsporium gypseum</i></u>	Colonias blancas a café claro en periferia con surcos radianes y micelio pulverulento, borde polvoso o granulento. Reverso color amarillo - pardo	Macroconidias abundantes de pared delgada y elipsoidales con 4-6 tabiques
<u><i>Microsporium fulvum</i></u>	Colonias blancas con centro ligeramente elevado de color ante claro y se tornan aterciopeladas. Reverso color amarillo - ante.	Macroconidias en forma de semillas de ajonjolí de pared delgada, con 4-6 tabiques, se tiñen en menor intensidad que las hifas
<u><i>Microsporium nanum</i></u>	Colonias umbonadas blancas - amarillentas, que se tornan aterciopeladas y de color ante, con crecimiento radial y borde vellosa. Reverso de color café	Macroconidias tabicadas en forma de pera y de tamaño ligeramente pequeño
<u><i>Trichophyton rubrum</i></u>	Colonias umbonadas, con aspecto pulverulento aterciopelado de color café claro - púrpura y crecimiento radial. Reverso color café rojizo. En tubo produce un color vino	Macroconidias alargadas, de pared delgada y tabicadas
<u><i>Trichophyton tonsurans</i></u>	Colonias blancas con centro amarillo, con relieves y hundimiento, micelio algodonoso corto). Reverso color café rojizo intenso	Macroconidias alargadas de pared delgada y tabicadas (de 6-8 tabiques) y con abundantes microconidias
<u><i>Trichophyton mentagrophytes</i></u>	Colonias umbonadas, de amarillo a blancas con micelio aterciopelado y crecimiento radial, borde vellosos. Reverso de color amarillo.	Macroconidias alargadas en forma de lápiz, de pared gruesa, tabicadas (6-8 tabiques). Microconidias redondeadas, dispuestas a lo largo de los lados de las hifas
<u><i>Trichophyton schoenleinii</i></u>	Colonias pequeñas de color amarillo a blanco - ante, de aspecto polvoso, pliegues irregulares (cerebriforme), con crecimiento lento. Reverso color ante.	No presenta macroconidias, se observan en las hifas las estructuras llamadas "candelabros fávicos".
<u><i>Trichophyton terrestre</i></u>	Colonias blancas con centro de color crema a ante y micelio aterciopelado, borde algodonoso. Reverso color ante - amarillo.	Microconidias que salen de la hifa basal formando un ángulo de 90°, son menos pigmentadas las hifas que las primeras, la punta de la hifa puede estar enrollada o formando una clamidiospora, las macroconidias son en forma de lagrima y escasas.
<u><i>Trichophyton verrucosum</i></u>	Colonias umbonadas de color blanco - ante, con micelio de tipo aterciopelado bajo y de crecimiento lento. Reverso color ante	En SDA forman hifas delgadas y clamidiosporas a lo largo de la hifa cuando el cultivo es maduro, en SDA no presentan macroconidias, solo microconidias en forma de lagrimas
<u><i>Trichophyton soudanense</i></u>	Colonias blancas con centro crateriforme y pliegues profundos hacia las orillas. Reverso color amarillo a anaranjado	Hifas septadas que nacen de la hifa basal o madre, no presenta macroconidias, pero si hay artroconidios en forma de lagrimas pequeñas
<u><i>Trichophyton violaceum</i></u>	Colonias blancas con centro umbonado y micelio aterciopelado bajo. Reverso color blanco - ante	Se observan hifas en forma de astas de renos con escasa producción de macroconidias

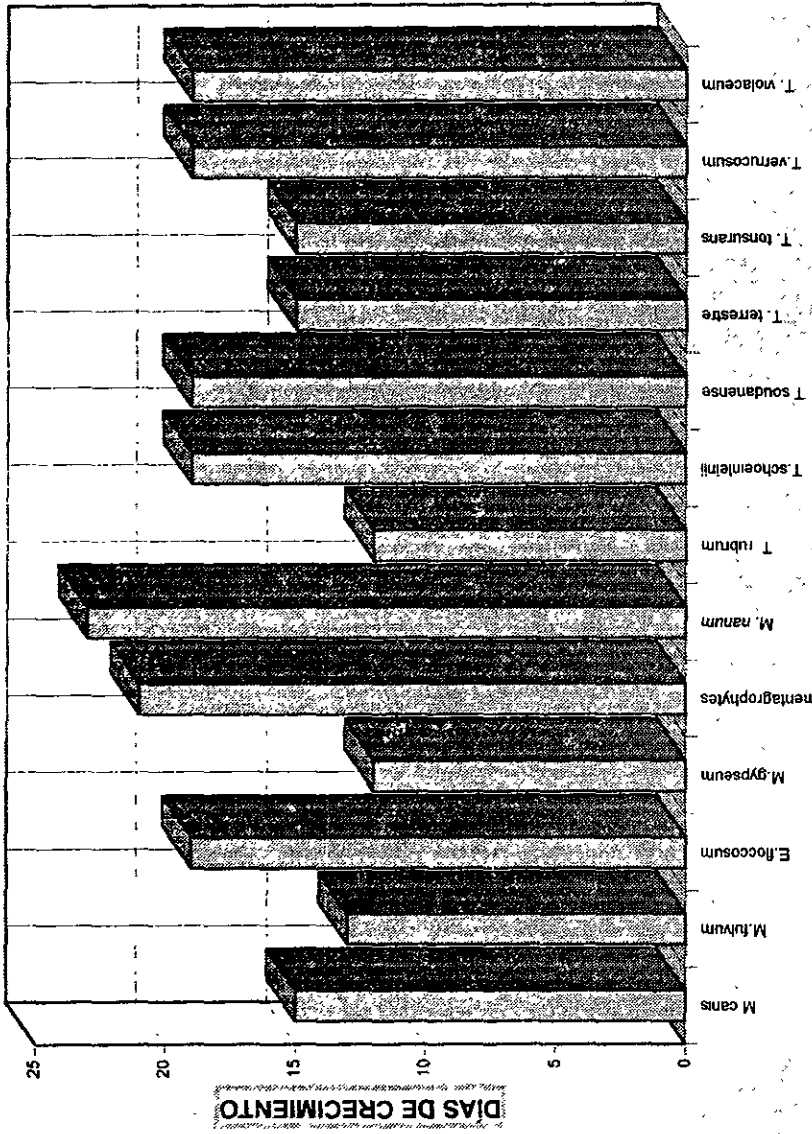
**TABLA 1**

**CRECIMIENTO DE DERMATOFITOS EN CAJA CON AGS.**

( GRAFICA 1 )

<b>DERMATOFITOS</b>	<b>DÍAS DE CRECIMIENTO MÁXIMOS.</b>
<i>Microsporum canis</i>	15
<i>Microsporum fulvum</i>	13
<i>Epidermophyton floccosum</i>	19
<i>Microsporum gypseum</i>	12
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	21
<i>Microsporum nanum</i>	23
<i>Trichophyton rubrum</i>	12
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	19
<i>Trichophyton soudanense</i>	19
<i>Trichophyton terrestre</i>	15
<i>Trichophyton tonsurans</i>	15
<i>Trichophyton verrucosum</i>	19
<i>Trichophyton violaceum</i>	19

GRÁFICA 1  
CRECIMIENTO EN CAJA CON AGS



DERMATOFITOS

**TABLA 2**

**CRECIMIENTO DE LOS DERMATOFITOS EN AGAR GLUCOSA  
SABOURAUD Y LACTRIMEL. ( EN TUBO )**

( GRAFICA 2 )

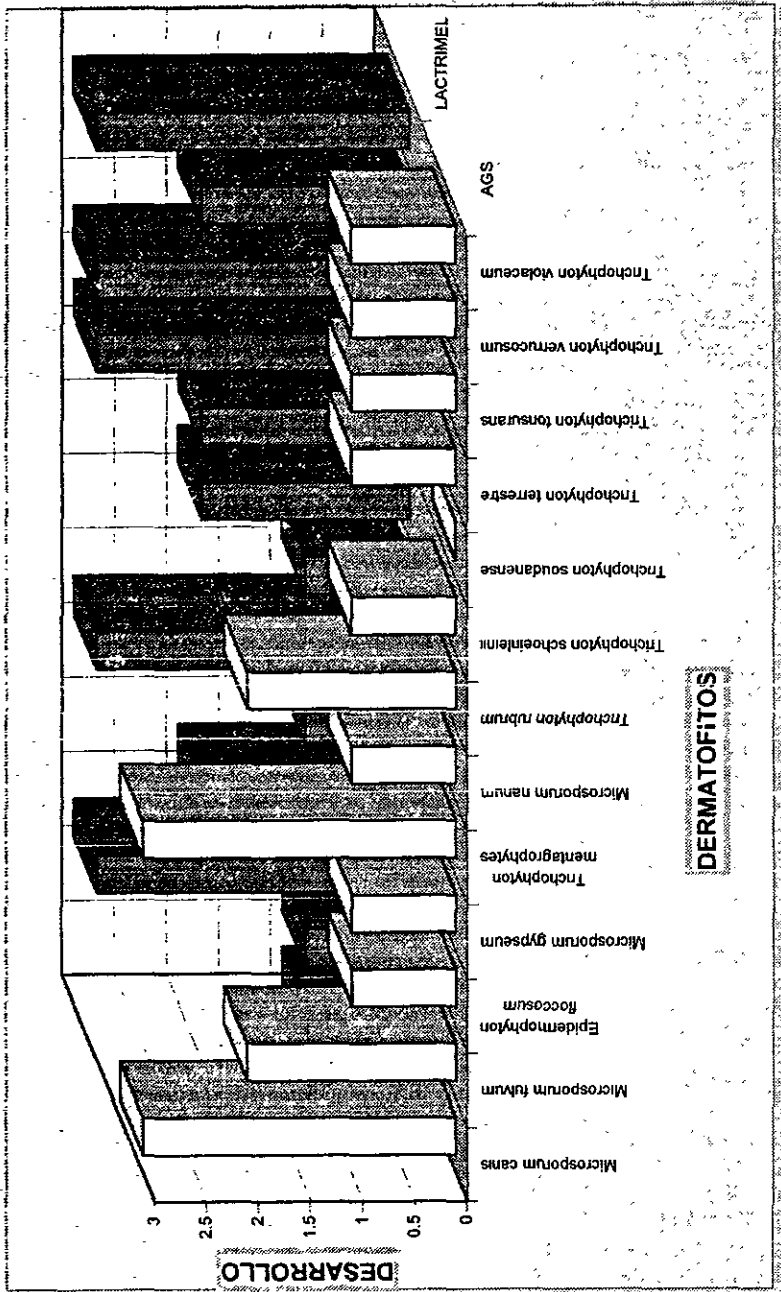
DERMATOFITOS	AGS DÍAS	LACTRIMEL DÍAS
<i>Microsporum canis</i>	3	1
<i>Microsporum fulvum</i>	2	1
<i>Epidemophyton floccosum</i>	1	3
<i>Microsporum gypseum</i>	1	2
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3	1
<i>Microsporum nanum</i>	1	3
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	1
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	1	2
<i>Trichophyton soudanense</i>	0	2
<i>Trichophyton terrestre</i>	1	3
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1	3
<i>Trichophyton verrucosum</i>	1	2
<i>Trichophyton violaceum</i>	1	3

**NOTA:** Desarrollo: 1) Escaso ; 2) Regular ; 3) Abundante



**GRAFICA 2**  
**CRECIMIENTO DE LOS DERMATOFITOS EN AGAR GLUCOSA SABOURAUD ( AGS) Y**  
**LACTRIMEL. ( EN TUBO )**

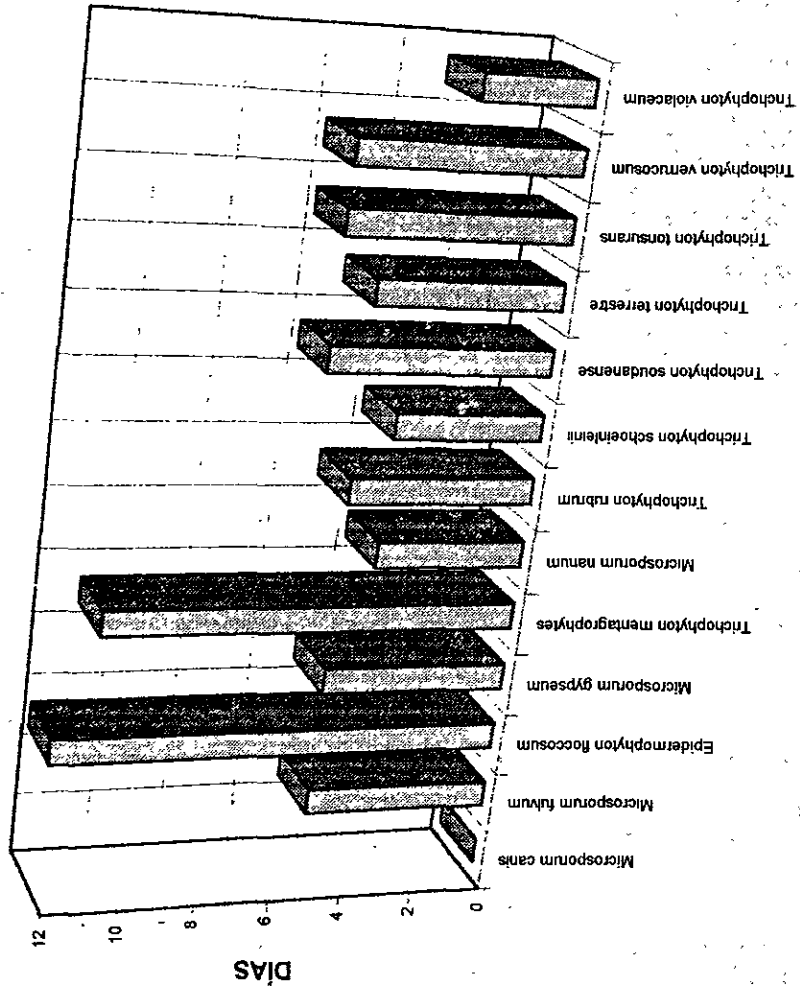
Desarrollo: 1) Escaso;2)Regular;3)Abundante.



**DERMATOFITOS**

<p style="text-align: center;"><b>TABLA 3</b></p> <p style="text-align: center;"><b>TIEMPO ÓPTIMO DE CONIDIACIÓN DE LOS DERMATOFITOS EN MICRO CULTIVO.</b></p> <p style="text-align: center;"><b>( GRAFICA 3 )</b></p>	
<b>DERMATOFITOS</b>	<b>TIEMPO ÓPTIMO DE CONIDIACIÓN DÍAS</b>
<i>Microsporum canis</i>	0
<i>Microsporum fulvum</i>	5
<i>Epidermophyton floccosum</i>	12
<i>Microsporum gypseum</i>	5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	11
<i>Microsporum nanum</i>	4
<i>Trichophyton rubrum</i>	5
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	4
<i>Trichophyton soudanense</i>	6
<i>Trichophyton terrestre</i>	5
<i>Trichophyton tonsurans</i>	6
<i>Trichophyton verrucosum</i>	6
<i>Trichophyton violaceum</i>	3

GRÁFICA 3  
 TIEMPO ÓPTIMO DE CONIDIACIÓN DE LOS DERMATOFITOS EN MICROCULTIVO



DERMATOFITOS

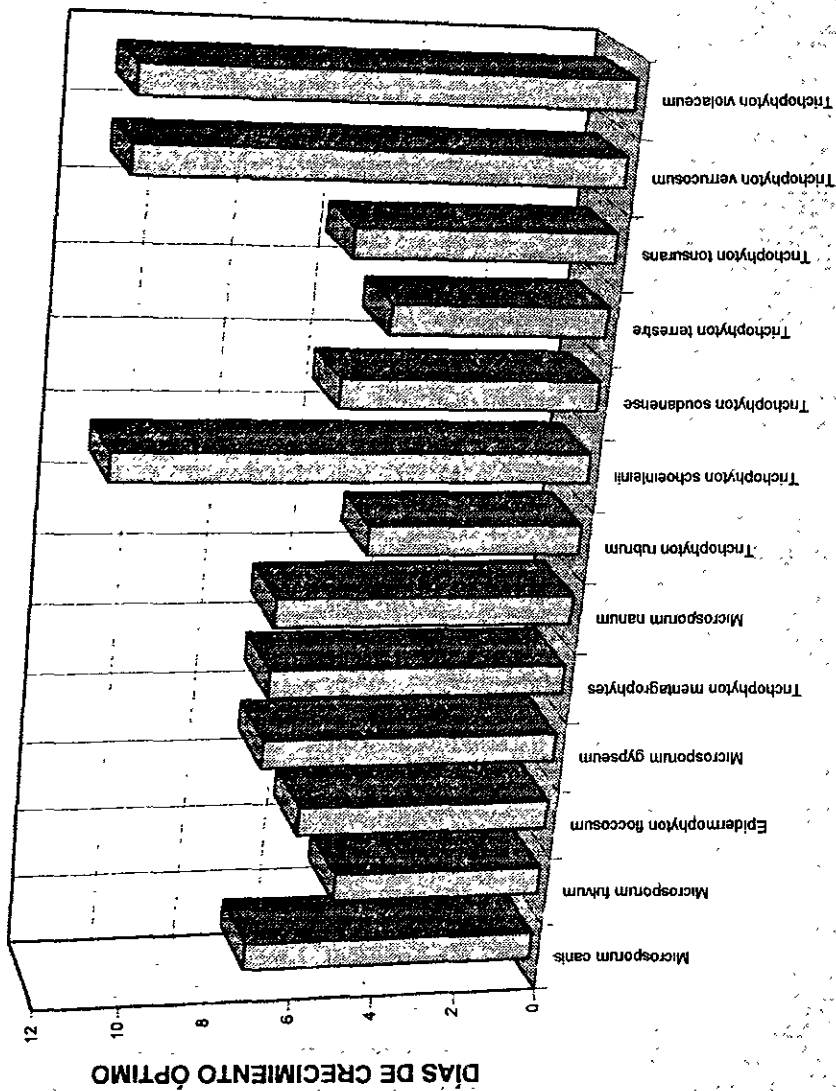
**TABLA 4**

**DÍAS DE CRECIMIENTO ÓPTIMO EN MICROCULTIVO CON  
AGAR GLUCOSA SABOURAUD.**

( GRAFICA 4 )

<b>DERMATOFITOS</b>	<b>DÍAS DE CRECIMIENTO ÓPTIMO</b>
<i>Microsporum canis</i>	7
<i>Microsporum fulvum</i>	5
<i>Epidermophyton floccosum</i>	6
<i>Microsporum gypseum</i>	7
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	7
<i>Microsporum nanum</i>	7
<i>Trichophyton rubrum</i>	5
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	11
<i>Trichophyton soudanense</i>	6
<i>Trichophyton terrestre</i>	5
<i>Trichophyton tonsurans</i>	6
<i>Trichophyton verrucosum</i>	11
<i>Trichophyton violaceum</i>	11

GRÁFICA 4  
 DÍAS DE CRECIMIENTO ÓPTIMO EN MICROCULTIVO CON AGAR GLUCOSA SABOURAUD



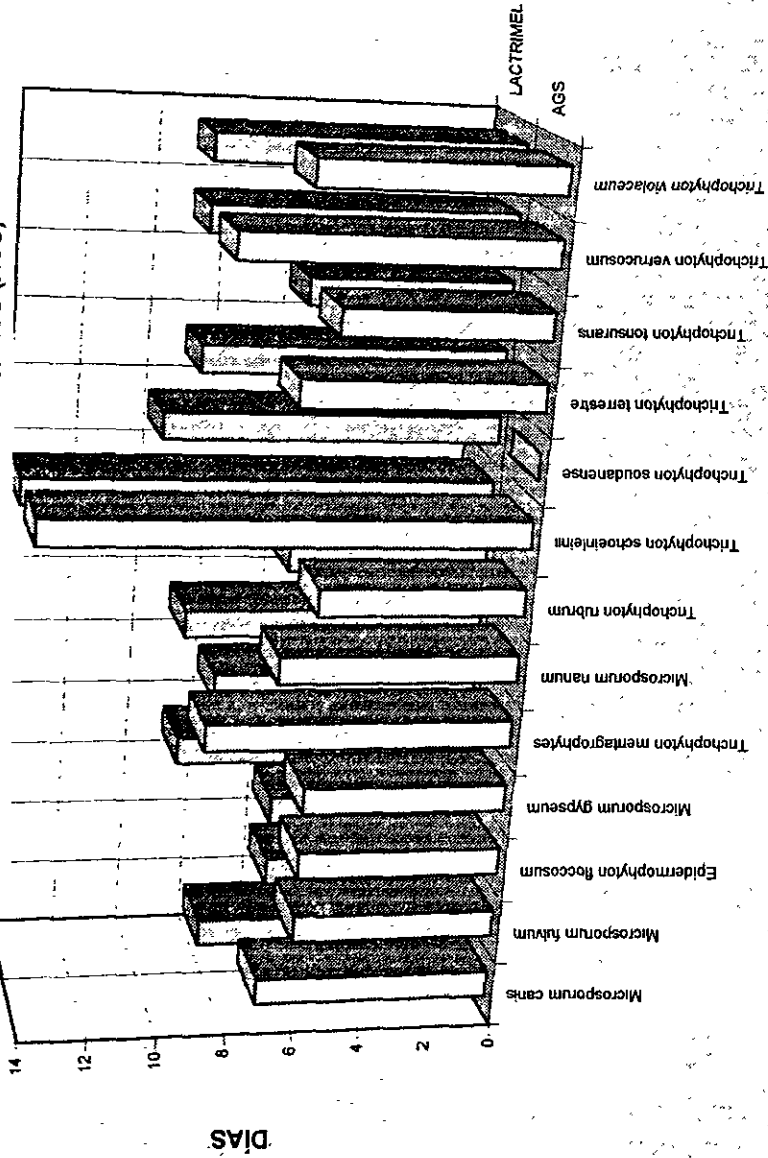
**TABLA 5**

**TIEMPO DE CRECIMIENTO DE LOS MICROCULTIVOS EN  
LACTRIMEL Y AGAR GLUCOSA SABOURAUD.**

( GRAFICA 5 )

<b>DERMATOFITOS</b>	<b>AGS DÍAS</b>	<b>LACTRIMEL DÍAS</b>
<i>Microsporum canis</i>	7	8
<i>Microsporum fulvum</i>	6	6
<i>Epidemophyton floccosum</i>	6	6
<i>Microsporum gypseum</i>	6	9
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9	8
<i>Microsporum nanum</i>	7	9
<i>Trichophyton rubrum</i>	6	6
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	14	14
<i>Trichophyton soudanense</i>	0	10
<i>Trichophyton terrestre</i>	7	9
<i>Trichophyton tonsurans</i>	6	6
<i>Trichophyton verrucosum</i>	9	9
<i>Trichophyton violaceum</i>	7	9

GRÁFICA 5  
 TIEMPO DE CRECIMIENTO DE LOS MICROCULTIVOS  
 EN LACTRIMEL Y AGAR GLUCOSA SABOURAUD (AGS)



DERMATOFITOS

– FOTOGRAFÍAS –



Fotografía 19. Macroconidia de *Microsporium nanum*, tomada en el Fotomicroscopio Olympus de la F.E.S. Zaragoza

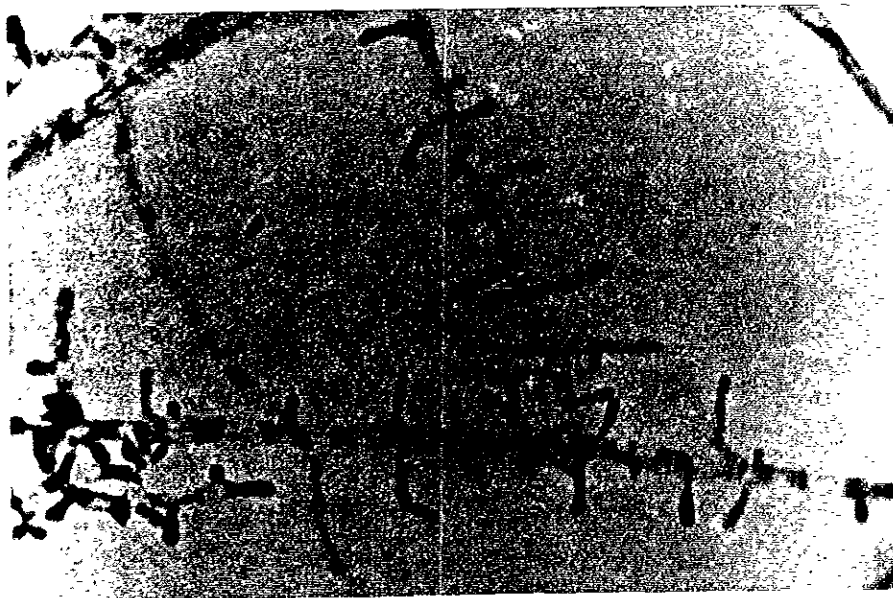


Fotografía 24. Macroconidia de *Microsporium canis*, tomada en el Fotomicroscopio Olympus de la F.E.S. Zaragoza

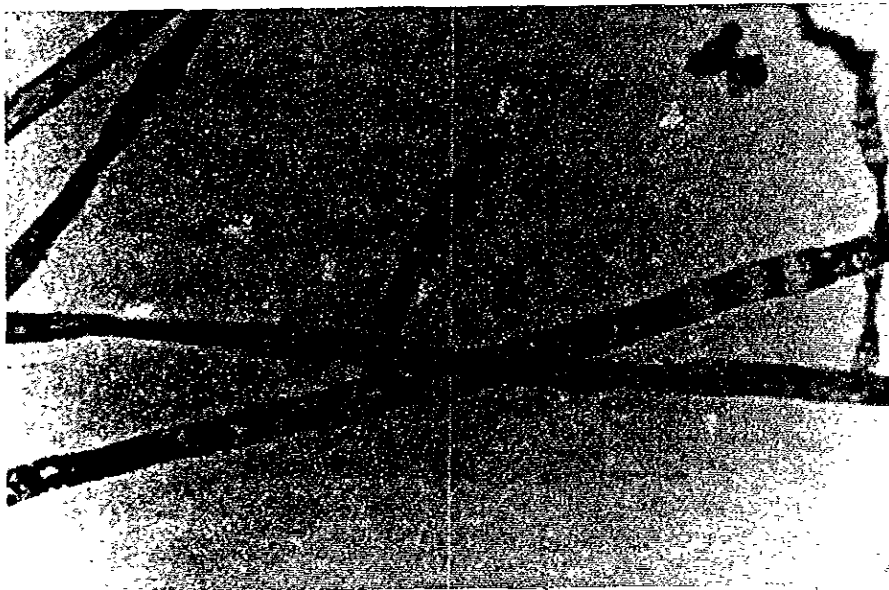




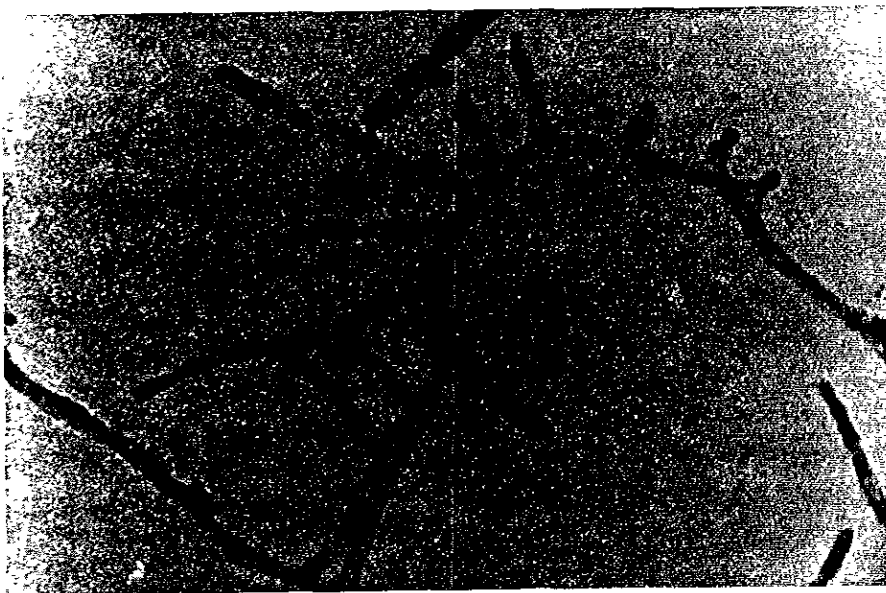
Fotografía 5. Microconidias de *Trichophyton tonsurans*, tomada en Fotomicroscopio Olympus de la FES Zaragoza



Fotografía 12. Macroconidias de *Epidermophyton floccosum*, tomada en Fotomicroscopio Olympus de la FES Zaragoza



Fotografía 4. Macroconidia de *Trichophyton tonsurans*, tomada en Fotomicroscopio Olympus de la FES. Zaragoza.



Fotografía 20. Hifas en Candelabro fávico de *Trichophyton schoenleinii*, tomada en Fotomicroscopio Olympus de la FES. Zaragoza.

# DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 1) ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE TINCIÓN

- a) La técnica de azul de Anilina Lactofenol es una modificación a la técnica de Azul de Algodón Lactofenol, en la que cambia el colorante y se mantiene la concentración de 0.05g del mismo, con un tiempo de exposición de 24-48 hrs
- b) En el presente trabajo se modificó la concentración de Azul de Anilina a 0.5 g y el tiempo de exposición se redujo a 2 horas, con la cual se obtiene una coloración homogénea y se pueden apreciar las estructuras fúngicas de manera óptima (septos, hifas, núcleos, macroconidias, microconidias).

## 2) TIEMPO DE CRECIMIENTO DE MICROCULTIVOS EN AGAR GLUCOSA SABOURAUD Y AGAR LACTRIMEL

- a) La gráfica de tiempos de crecimiento en microcultivo utilizando agar Lactrimel y AGS, no muestra diferencias significativas en días entre ambos medios, sin embargo.
- b) En el caso de *T. soudanense* se observa un crecimiento intermedio en Lactrimel y nulo en AGS, lo que indica que la cepa se enriqueció en dicho medio. En este estudio el agar Lactrimel se utilizó para fortificar las cepas de dermatofitos, observándose que es un medio útil para favorecer la conidiación en los siguientes dermatofitos *T. soudanense* y *T. schoenleimi*.

TIEMPO ÓPTIMO DE CRECIMIENTO EN AGAR GLUCOSA SABOURAUD	
Tiempo de Crecimiento	Cepas
RÁPIDOS	<i>M. fulvum</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>T. terrestre</i> , <i>E. floccosum</i> , <i>T. soudanense</i> , <i>T. tonsurans</i> .
INTERMEDIOS	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>M. nanum</i> .
LENTOS	<i>T. schoenleimi</i> , <i>T. verrucosum</i> , <i>T. violaceum</i> .

Se clasificaron los dermatofitos, conforme a su rapidez de crecimiento en. RÁPIDOS de 1 a 4 días, INTERMEDIOS de 5 a 9 días y LENTOS de 10 a 16 días.

## 3) TIEMPO ÓPTIMO DE CONIDIACIÓN.

- a) En cuanto a la conidiación se tuvieron problemas con 2 de las cepas *M. canis* y *T. mentagrophytes*. Este último creció, pero no presentó conidias (macro y microconidias), por lo que se fortificó la cepa con agar Borelli modificado para después tomar la muestra y realizar el microcultivo en agar Sabouraud controlando la temperatura a 25C+/-1C. Obteniéndose con el enriquecimiento las estructuras de *T. mentagrophytes* (microconidias y pequeñas macroconidias) que en NaCl puede favorecer la producción de macroconidias de este dermatofito.
- b) No se cumplió en su totalidad con todos los objetivos planteados en el presente trabajo debido a que *M. canis* no presentó conidiación, por lo que se le dió el mismo tratamiento que a *T. mentagrophytes*, sin embargo, en este caso la presencia de macroconidias fue muy escaso, contrario a lo que se reporta en la literatura. Esto pudo deberse a que las cepas sembradas en agar glucosa Sabouraud de donde se obtuvieron las muestras para los microcultivos de este estudio se almacenaron a 4 C; lo que causa progresivamente inusuales macroconidias, particularmente ciertos aislados disgónicos y aconidiales de *M. canis*. Sin embargo, esta puede ser una propiedad innata de los dermatofitos, estos resultados indican reversibilidad de fenotipos disgónicos o atípicos debido a factores exógenos como nutrición y condiciones ambientales; resultando en la reactivación de formación de macroconidias. (28)

- c) Estos problemas que se presentaron en los casos anteriores, se debieron a que la temperatura fue un factor no favorable para la conidiación, ya que no se controló, variando de 27C+/-3 C debido al mal estado del equipo. En el caso de *M. canis*, no sólo afectó éste factor, sino también los nutrientes, ya que como marca Bonifaz en su libro de Micología Médica Básica las peptonas favorecen la conidiación.
- d) Sin embargo la variación de temperatura es favorable para *T. schoenleemii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum* y *T. violaceum*; como marca la literatura a 28-30° C se tiene un crecimiento óptimo y estos dermatofitos presentaron estructuras que generalmente se encuentran en medios enriquecidos y no en agar Sabouraud., cabe mencionar que *T. schoenleemii*, *T. soudanense* y *T. violaceum* se inocularon de agar Borelli a Sabouraud, y favoreciendo la producción de estructuras.
- e) El aspecto macroscópico de las colonias puede variar mucho con el tipo de peptona que se utilice, así como el pH y la consistencia del medio; estos factores, junto con la temperatura y la humedad de incubación determinan cambios substanciales en cuanto a la velocidad de crecimiento, tamaño de las colonias, textura, producción de pigmento y otros factores esenciales para una correcta identificación del dermatofito ( 38 )

## CONCLUSIONES

- 1) Con la modificación y estandarización exitosa de la técnica de Azul de Anilina Lactofenol y el tiempo de tinción, se podrá aplicar en la práctica de laboratorio y posteriores trabajos de investigación en este campo, ya que es un método rápido y eficaz, queda una coloración adecuada a las estructuras micológicas
- 2) El material generado (laminillas, diapositivas y fotografías) servirá de material didáctico y de apoyo para las carreras de Q.F B., Odontología y Medicina.
- 3) Con la estandarización de las 11 cepas de dermatofitos se podrán obtener tricofitinas confiables para realizar otros proyectos clínicos de corte inmunológico.
- 4) Se pretende extender este trabajo a otros hongos miceliales (hongos contaminantes) que se encuentran en el cepario del Laboratorio de producción de la FES Zaragoza
- 5) Debido a los problemas que se presentaron con *T. mentagraphytes* y *M. canis* se sugiere iniciar un proyecto de investigación, para determinar las causas por las cuales no se obtuvo la conidiación adecuada, ya que presuntamente los nutrientes fueron insatisfactorios y la temperatura no se controló adecuadamente.

- c) Estos problemas que se presentaron en los casos anteriores, se debieron a que la temperatura fue un factor no favorable para la conidiación, ya que no se controló, variando de  $27C \pm 3 C$  debido al mal estado del equipo. En el caso de *M. canis*, no sólo afectó éste factor, sino también los nutrientes, ya que como marca Bonifaz en su libro de Micología Médica Básica las peptonas favorecen la conidiación.
- d) Sin embargo la variación de temperatura es favorable para *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum* y *T. violaceum*; como marca la literatura a  $28-30^{\circ} C$  se tiene un crecimiento óptimo y estos dermatofitos presentaron estructuras que generalmente se encuentran en medios enriquecidos y no en agar Sabouraud., cabe mencionar que *T. schoenleinii*, *T. soudanense* y *T. violaceum* se inocularon de agar Borelli a Sabouraud, favoreciendo la producción de estructuras
- e) El aspecto macroscópico de las colonias puede variar mucho con el tipo de peptona que se utilice, así como el pH y la consistencia del medio; estos factores, junto con la temperatura y la humedad de incubación determinan cambios substanciales en cuanto a la velocidad de crecimiento, tamaño de las colonias, textura, producción de pigmento y otros factores esenciales para una correcta identificación del dermatofito (38)

## CONCLUSIONES

- 1) Con la modificación y estandarización exitosa de la técnica de Azul de Anilina Lactofenol y el tiempo de tinción, se podrá aplicar en la práctica de laboratorio y posteriores trabajos de investigación en este campo, ya que es un método rápido y eficaz, queda una coloración adecuada a las estructuras micológicas
- 2) El material generado (laminillas, diapositivas y fotografías) servirá de material didáctico y de apoyo para las carreras de Q.F.B., Odontología y Medicina
- 3) Con la estandarización de las 11 cepas de dermatofitos se podrán obtener tricofitinas confiables para realizar otros proyectos clínicos de corte inmunológico
- 4) Se pretende extender este trabajo a otros hongos miceliales (hongos contaminantes) que se encuentran en el cepario del Laboratorio de producción de la FES Zaragoza.
- 5) Debido a los problemas que se presentaron con *T. mentagrophytes* y *M. canis* se sugiere iniciar un proyecto de investigación, para determinar las causas por las cuales no se obtuvo la conidiación adecuada, ya que presuntamente los nutrientes fueron insatisfactorios y la temperatura no se controló adecuadamente.

## GLOSARIO

1. **Acérvulo:** Grupo de conidios que se une de modo directo al micelio subyacente.
2. **Actinomiceto:** Bacteria filamentosa Gram positiva que pertenece a la orden de los Actinomycetales
3. **Acuminado:** Que tiene una protuberancia o elevación cerca o en el centro de la colonia
4. **Aeróbico:** Que crece en presencia de oxígeno molecular
5. **Aleuroconidio:** Conidios que se producen en el extremo dilatado de una hifa conidiógena, de la que se liberan por lisis o fracturas de la célula basal ( sinónimo, aleuriospora).
6. **Aleuriospora:** Se ha usado ampliamente en la macroconidia y microconidia de dermatofitos. Una de sus funciones es asegurar la sobrevivencia del hongo.
7. **Anaeróbico:** Que crece en ausencia de oxígeno molecular.
8. **Anamorfo:** para las formas reproductivas asexuales o somáticas.
9. **Anélide:** Célula conidiógena que produce conidios en sucesión basípeta, quedando restos o cicatrices anulares llamadas anelaciones
10. **Antropofílico:** Hongo cuyo hábitat natural es el hombre.
11. **Artroconidio:** Conidio tálco producido por fragmentación de la hifa y que se libera por un proceso de rexólisis o de esquizólisis.
12. **Asca:** Estructura en forma de saco que contiene ascosporas que se forman como resultado de cariogamia y meiosis
13. **Ascocarpo:** Cuerpo fructífero complejo que contiene ascas.
14. **Ascomycetes:** Grupo de hongos que se reproduce por medio de ascosporas.
15. **Ascomycotina:** Categoría taxonómica de los hongos (subdivisión) en la cuál la reproducción es de tipo sexual formándose ascas con ascosporas.
16. **Ascospora:** Espora haploide producida generalmente dentro de un asca
17. **Autótrofo:** Microorganismo que puede crecer sin utilizar sustratos orgánicos como fuente de energía
18. **Auxótrofo:** Hongo que para su desarrollo en un medio requiere de sustancias específicas
19. **Basidio:** Estructura a partir de la cual se forman las basidiosporas como resultado de la cariogamia y meiosis, los basidios son característicos de los Basidiomycetes.
20. **Basidiospora:** Espora haploide producida sobre el basidio
21. **Basípeta:** Conidiogénesis en cadena en la que cada nuevo elemento se produce en la base de la cadena a partir de filiales o anéides. El conidio más viejo se encuentra en el ápice de la cadena
22. **Candelabro fávico:** Hifas ramificadas e hinchadas en los extremos, que se observan principalmente en *Trichophyton schoenleinii*.
23. **Carpóforo:** Cuerpo fructífero de los Basidiomycetes que contiene a los basidios y basidiosporas.
24. **Cenocítico:** Micelio continuo con muchos núcleos. Que no tiene tabique.
25. **Células fumagoides:** Células dematiáceas, redondas, de pared gruesa, en ocasiones septadas. Estas células son diagnósticas de la cromomicosis.
26. **Cerebriforme:** Que tiene pliegues como el cerebro.
27. **Clamidioconidio:** Espora asexual ( conidio ) de origen hifal, forma globosa y pared gruesa con función de resistencia ( sinónimo, clamidiospora).
28. **Clava:** En forma de palo o basto; estructura que rodea el grano
29. **Columnella:** Estructura en forma de domo, estéril, localizada en el extremo distal del esporangióforo
30. **Conidio:** Propágulo originado por un proceso de reproducción asexual inmóvil y producido externamente en una hifa especializada ( conidioforo ) o no
31. **Conidioforo:** Hifa fértil, diferenciada y especializada sobre la cual se originan directa o indirectamente los conidios.
32. **Coremio:** Conjunto de filamentos con esporas.
33. **Dematiáceo:** Hongo provisto de pigmento marrón, oscuro o negro, de la familia Dematiaceae
34. **Dendrítico:** Con ramificaciones irregulares
35. **Denticulo:** Pequeña proyección del filamento.
36. **Dermatofito:** Hongo queratinofílico que pertenece a uno de los géneros siguientes *Trichophyton*, *Epidermophyton* o *Microsporium*.
37. **Dimorfismo:** Propiedad que tienen algunos hongos patógenos de presentar una morfología en vida libre y otra diferente, en la fase parasitaria.

- 38 **Disgónico:** hace referencia a una variante de crecimiento lento atípico ( en *M. canis* y *M. audouini*)
- 39 **Ectothrix:** Tipo de parasitación dermatofítica en donde las esporas forman una cubierta en la parte externa del pelo.
- 40 **Endo- ectothrix:** Infección del pelo en la cual las esporas y filamentos de dermatofitos se encuentran tanto dentro como fuera del pelo.
- 41 **Endospora:** Espora producida en el interior de una esférula o de un esporangio cerrado
- 42 **Endothrix:** tipo de parasitación dermatofítica en la cual las esporas se encuentran en el interior del pelo
- 43 **Equinulado:** Hace referencia a determinadas estructuras fúngicas que en su superficie presentan proyecciones, en general puntiformes o espinosas.
- 44 **Ergosterol:** esterol común en los hongos. constituyente de la pared y membrana celular.
- 45 **Escútula:** Estructura micelial característica del favus.
- 46 **Espora:** En micología estructura producida por un proceso sexual o asexual La cual es una forma de resistencia
- 47 **Esporangio:** Estructura reproductora asexual formadora de endosporas ( esporangiosporas )
- 48 **Esporangióforo:** Hifa especializada portadora de un esporangio
- 49 **Esporangiospora:** Espora asexual que se produce dentro de un esporangio
- 50 **Esquizólisis:** Proceso enzimático de separación conidial conidio - célula conidiógena o conidio - conidio, a través de la fisión de un septo doble.
- 51 **Estado imperfecto:** Condición de los hongos que presenta reproducción asexual (anamorfismo)
- 52 **Estado perfecto:** Condición de los hongos que presenta reproducción sexual (teleomorfismo)
- 53 **Esterigma:** Punto de estrechamiento que origina una basidiospora sobre un basidio
- 54 **Favus:** Forma inflamatoria de tiña producida por *T. schoenleinii*
- 55 **Fermentación:** Capacidad de algunos hongos de utilizar diversos azúcares como fuente de energía con producción de ácido y gas
- 56 **Fiálide:** Célula conidiógena en forma de botella o dedo, productora de conidios basipetos
- 57 **Flocoso:** De textura algodonosa.
- 58 **Fungi imperfecti:** Denominación del grupo taxonomico de hongos de los cuales no se conoce su fase sexual o estado perfecto.
- 59 **Fusiforme:** En forma de huso.
- 60 **Gema:** Órgano bien conocido de las algas, briofitas y pteridofitas. Algunas formas son similares a las clamidiosporas de los hongos.
- 61 **Geofílico:** Hongo cuyo hábitat natural es el suelo
- 62 **Glabra:** Hace referencia a la colonia fúngica lisa casi sin micelio aéreo.
- 63 **Godetes fávicos:** Depresiones observadas en la piel cabelluda producidas por la infección de *Trichophyton schoenleinii*.
- 64 **Hábitat:** Nicho ecológico donde el hongo crece y se desarrolla normalmente.
- 65 **Heterotálico:** Especies que requieren una conjugación entre el micelio de dos talos de distinto signo para la producción de esporas sexuales
- 66 **Hialino:** De color claro, transparente o incoloro.
- 67 **Hifa en espiral:** Hifa torcida en espiras.
- 68 **Hifas peridiales:** Hifas gruesas diferenciadas que rodean al ascocarpo.
- 69 **Hifa en raqueta:** Filamento fúngico formado por una sucesión de células piriformes.
- 70 **Hifa:** Elemento estructural fundamental de los hongos; puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular tomando la forma de filamento septado o aseptado. El conjunto de hifas forma el micelio
- 71 **Holoártica:** Reproducción sexual por artroconidios que involucra a todas las capas de la pared celular y donde la fragmentación se lleva a cabo por un proceso de esquizólisis.
- 72 **Holoblástica:** Reproducción asexual por blastoconidios que involucra a toda la pared fúngica a través de un proceso blástico
- 73 **Holomorfo:** para los hongos que incluyen a ambos anamorfos y teleomorfos
- 74 **Holotática:** Tipo de conidiación en donde los conidios se originan a partir de las dos capas de la célula conidiógena a través de un proceso tático.
- 75 **Hongo:** Organismo eucariote, perteneciente al reino Fungi
- 76 **Hongos superiores:** Agrupa a los Deuteromycetes, Zygomycetes, Basidiomycetes y Ascomycetes.
- 77 **Ide:** Manifestación cutánea a distancia de hipersensibilidad a los productos fúngicos liberados durante la infección
- 78 **Imbricada:** Con referencia a un tipo de tiña, que presenta un patrón regular de sobrecapas.
- 79 **Intertriginosa:** Que ocurre entre dos superficies opuestas de piel
- 80 **Intercalar:** Que se dispone entre dos unidades de una hifa

81. **Levaduriforme:** Célula fungica que tiene forma de levadura.
82. **Macroconidio:** Conidio que presenta un tamaño mayor de cinco micras y que generalmente presenta *septos*
83. **Megaspórica:** Término empleado por Sabouraud para describir la tña de la cabeza de tipo Ectothrix en donde se observan grandes esporas en la superficie del pelo.
84. **Micelio aéreo:** Micelio que se desarrolla sobre el sustrato y en el cual se encuentran las estructuras reproductoras.
85. **Micelio cenocítico:** Micelio cuyas hifas no presentan *septos* (micelio continuo) y en donde los núcleos y demás organelos circulan libremente.
86. **Micelio estéril:** Micelio que no forma estructuras de reproducción
87. **Micelio septado:** Micelio en donde las hifas presentan tabicaciones dispuestas en forma más o menos regular; cada tabicación presenta uno o varios poros que permiten la comunicación citoplasmática intercelular
88. **Micelio vegetativo:** Conjunto de hifas que se desarrollan en el interior del sustrato y su función principal es nutricional
89. **Micelio:** Conjunto de hifas que constituye el cuerpo de un hongo
90. **Microconidio:** Conidio de un tamaño menor de tres micras, generalmente unicelular.
91. **Microide:** Término usado por Sabouraud para referirse a las esporas pequeñas en la invasión ectothrix del pelo
92. **Nodoso:** Con engrosamiento en diferentes sitios.
93. **Oospora:** Espora de pared gruesa que se forma por la unión de gametos de los Oomycetes.
94. **Oportunista:** Microorganismo que habitualmente no causa enfermedad, pero que al producirse algún fenómeno de inmunodepresión en el huésped, lo puede infectar
95. **Pectinado:** En forma de peine.
96. **Pecnidio:** Estructura micelial con esporas asexuadas.
97. **Peridio:** Pared que envuelve un cuerpo fructífero ( hifas peridiales ).
98. **Piriforme:** En forma de pera.
99. **Pleomórfico:** Que tiene más de una forma. Se utiliza también para referirse a pérdida de las estructuras reproductoras ( esporas o conidios ) características que permiten identificar a algunos hongos, este fenómeno es frecuente en los dermatofitos.
100. **Polimorfo:** Hongo con más de una forma durante su ciclo vital.
101. **Queratinofílico:** Que prefiere la queratina.
102. **Querión:** Inflamación pustulosa de la piel cabelluda que involucra el folículo piloso
103. **Queratina:** Escleroproteína con alto contenido de cistina
104. **Quitina:** Polisacárido constituido por unidades de N-acetilglucosamina, que forma parte de la pared celular ( componente fibrilar) de los hongos
105. **Reproducción asexual:** Multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.
106. **Reproducción sexual:** Involucra la fusión de dos núcleos haploides compatibles y en los hongos da por resultado la producción de esporas.
107. **Reservorio Protoplásmico:** Es parte de la hifa y se forma en cultivos viejos. Esta estructura conecta al protoplasma con la célula de la hifa destruida. Por tanto, sólo es una estructura restauradora
108. **Rexólisis:** mecanismo de liberación de conidios por destrucción de las células que lo rodean
109. **Saprobio:** Ser heterótrofo que se nutre por materia orgánica muerta
110. **Septo:** Tabique que separa las células de las hifas de los hongos o algunos conidios o esporas
111. **Sésil:** Conidio que se une por su base directamente a la pared de la hifa.
112. **Teleomorfo:** para formas reproductivas sexuales.
113. **Verticilo:** Conjunto de conidióforos con un punto común.
114. **Vesícula:** Muchas especies desarrollan células hinchadas llamadas vesículas. bajo condiciones desfavorables. Su función es el almacenamiento de metabolitos de comida o materiales tóxicos.
115. **Zigospora:** Espora que resulta de la fusión de dos gametangios compatibles. Característica de los Zygomycetes
116. **Zoófilico:** Hongos cuyo hábitat natural son los animales inferiores.



## BIBLIOGRAFIA

1. Ajello L. Y Padhye A A "Formación de macroconidias en *Trichophyton soudanense*" Mykosen Berlin . 30(6) : 258-262 (1987).
2. Akin E.D. y Michaels. E. G. "*Microsporium gypseum* Desarrollo macroconidial revelado por microscopia de transmisión y de barrido". Sabouraudia. 10 : 52-55. (1972).
3. Alvarez Chacón, Et. Al. *Dermatofitosis en los niños Topografía de las Lesiones y Agentes Causales* INP México D F. ( 1997 ) ( trabajo de investigación )
4. Arenas Dermatología Atlas, Diagnóstico y Tratamiento. Mc Graw Hill México D F. (1988).
5. Arenas. Micología Médica Ilustrada, 1ª. ed México D. F. (1993).
6. Benavides M. Et. Al. " Diagnóstico de Laboratorio de las Dermatofitosis: Experiencia de 10 años en el área occidente de Santiago". REV.MED. CHILE. 119 : 1029-1032. (1991).
7. Bonifaz A." Micología Médica Básica" 1ª ed MENDEZ. México D.F. : 74-85. (1994 ).
8. Brasch. J "*Microsporium canis* con macroconidias polimorfas". Mycosen . 32 (I) : 33-38 (1988)
9. Carrada B.T. y Cifuentes J. "Las tiñas como problema de salud publica. avances y perspectivas terapéuticas". Infectología. México D. F. (9) : 553-566 (1987).
10. Casos de Dermatofitosis y dermatomicosis en los estados Unidos Mexicanos. I.N.D R E.,CODICE CIE 9a revision (1993).
11. Conant "Micología" Interamericana. México D F. (1972)
12. Culture media for Growing dermatophytes J. Am Acad. Dermatol.: ( 31) S107 - S108 (1994 )
13. Davis H Larone Medically Important Fungi (A guide to identificación). 3ª. ed. American Society Microbiology Press Washington D C. ( 1995 )
14. Decalo M. M ET. Al "Aislamiento de Dermatofitos en Pacientes con Diagnóstico Presuntivo de Dermatofitosis. "REV CUBANA. MED. TROP. 43 (2) : 103-106. (1991).
15. Diario Oficial. Secretaria de desarrollo Social Agosto. México D. F. (1994).
16. Garduño G. R "Creación de un Laboratorio de Micología Médica en la FES Zaragoza". Tesis de Licenciatura. UNAM. México D. F ( 1997 ).
17. Henry. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio Tood - Sanford - Davidsohn 7ª ed Salvat España. (1984 )
18. Incidencia de las Micosis en el Servicio de Micología del Centro Dermatológico Pascua en el Año de 1991 Revista del Centro dermatológico Pascua (1993). Vol. 2 No. 2 Mayo - Agosto Dermatophytoses in México City Micosis. 37 : 49 - 52 (1994).
19. Jawetz." Manual de Microbiología Médica". 9ª. ed. Ed. El manual moderno. México D F. (1981).
20. Knudsen E. A. " Aislamiento de dermatofitos de calzado con cinta adhesiva " Journal of Medical and Veterinary Mycology 25 : 59-61. (1986)
21. Kyung J. K. Et. Al "Relación enigmática de dos especies de *Microsporium*" Sabouraudia 15 : 325-332. (1977)
22. Leshner J. Et. Al. "Micosis Superficial de la Piel". Atención Médica Junio : 16-20. (1994).
23. López M.R. "Micología Médica". 1ª ed. Trillas . México D. F. : 32-46 (1995)
24. La reacción del Ácido peryódico de Schiff más Dimetilsulfóxido para el Diagnóstico de Micosis Superficiales y de Eritrasma en raspaduras de la Piel y Uñas Dermatología Revista Mexicana 38 ( 6 ) : 403 - 408 (1994)
25. M.J. Linch Metodos de Laboratorio 2ª ed. Interamericana México D F (1980)
26. Martínez. L J Mendez, F.H. Hernández, R.C. Oliva Micología Médica Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio 1ª. ed. Trillas Mexico D.F. (1995)
27. Matsumoto T. Y Ajello L. "Conceptos taxonómicos actuales, relativos a los dermatofitos y hongos relacionados" International Journal of Dermatology. U.S.A 26 (8) : 491-499. (1987)
28. Mavroudeas D. "Efecto de glucosa y tiamina en la formación de macroconidias en dermatofitos Cepas disgónicas de *Microsporium canis* en Atenas Grecia". Mycoses. 39 : 61-66. (1996)
29. Niimi K. "*Trichophyton mentagrophytes* desarrollo y germinación de macroconidias" Journal of Investigative Dermatology. 90 : 165-166. (1988).
30. Okkin and H.I. Marback Dermatología El manual moderno. México D. F. (1992)
31. Padhey. A "Una variante inusual de *Trichophyton tonsurans* var. Sulfureum". Journal of Medical and Veterinary Mycology. U.S.A. 32 : 147-150. (1994)

32. Pelczar. Microbiología. 4ª. ed Mc Graw Hill México D. F. (1982)
33. Pompa, J.M. Gutiérrez. Biología 1ª. ed Compañía editorial continental México D. F. (1970)
34. Rippon. Tratado de Micología Médica. 3ª. ed. Interamericana. México D. F (1990).
35. Sánchez J. "Aislamiento de cepas disgónicas de *Microsporium canis* en Bilbao (España)" Journal of Medical and Veterinary Mycology. Spain . 27 : 391-395. ( 1989)
36. Simon Gy. Y Galgóczy J. "Clamidiosporas de dermatofitos". Mykosen. Berlin . 29 (10) : 469-473. (1986).
37. Smith J.M.B y Rush-Munro F M. "Una inusual cepa de *Trichophyton rubrum* de Fuji". Sabouradia . 9 : 153-156 (1971)
38. Torres-Rodríguez , Micosis que Afectan Piel y Mucosas. Doyma España : 46-54. (1987)
39. Vries G.A. "Observaciones en *Trichophyton tonsurans*" Sabouraudia . 9 : 1-5. (1971)
40. Weigl E. Y Hejtmánek M. "Diferenciación de artrosporas de *Trichophyton mentagrophytes* controladas por factores físicos". Mykosen Berlin. 22 (5) : 167-172 (1979)

# INDICE DE ANEXOS

## ANEXO # 1

ESQUEMAS DE LOS DERMATOFITOS.....	52
GENERALIDADES .....	52
GÉNERO MICROSPORUM .....	53
GÉNERO TRICHOPHYTON .....	54
GÉNERO EPIDERMOPHYTON .....	55

## ANEXO # 2

### METODOLOGÍA Y TÉCNICAS

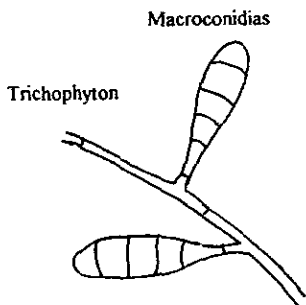
1) MEDIOS DE CULTIVO .....	56
2) MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO .....	56
3) MEDIOS QUE FAVORECEN LA CONIDIACIÓN .....	57
4) MEDIOS PARA DIFERENCIACIÓN .....	58
5) TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE MICROCULTIVO .....	60
6) TÉCNICAS DE TINCÓN .....	61

## ANEXO # 3

TABLAS DE TRABAJO .....	63
-------------------------	----

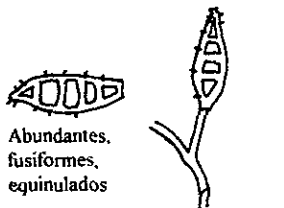
# ANEXO 1

ESQUEMAS DE LOS DERMATOFITOS Características microscópicas de los cinco dermatofitos más comunes en nuestro medio. ( 23 )



Escasos en forma de mazo

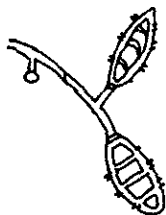
Microsporum



Abundantes, fusiformes, equinulados



Abundantes, elipsoidales, equinulados, en racimo.

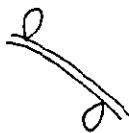


Epidermophyton

Abundantes lisos, en forma raqueta, en racimo



Escasos periformes



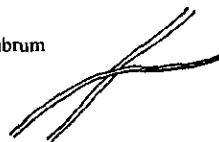
Abundantes periformes o irregulares



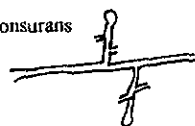
En racimo, abundantes redondos.



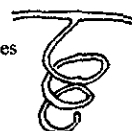
rubrum



tonsurans



mentagrophytes



canis

No diagnósticos

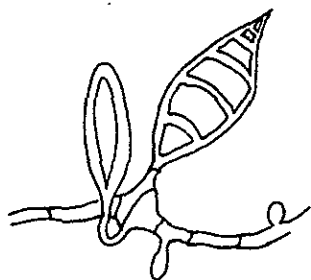
gypseum

No diagnósticos

floccosum

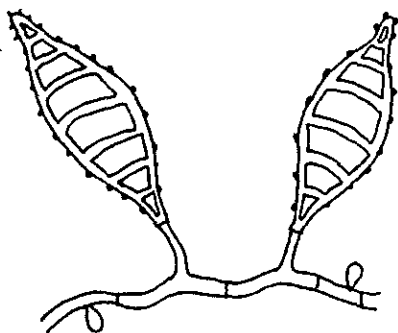
No diagnóstico

# MICROSPORUM

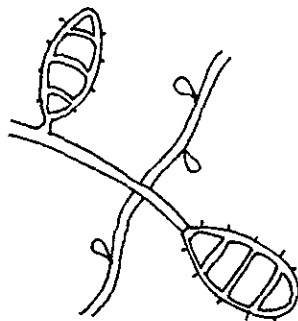


MACROCONIDIAS Y  
MICROCONIDIAS

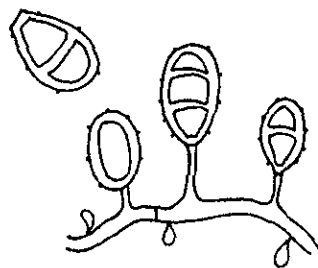
## ESPECIES DEL GENERO USADAS EN EL TRABAJO.



*M. canis*



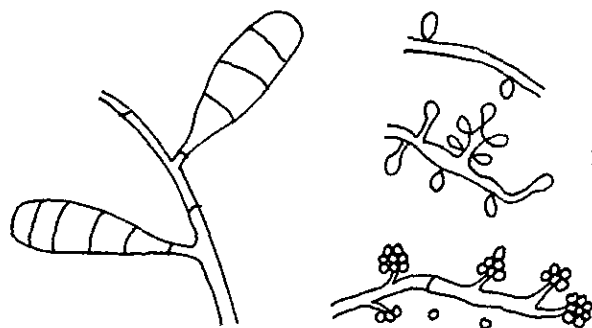
*M. gypsum*



*M. nanum*

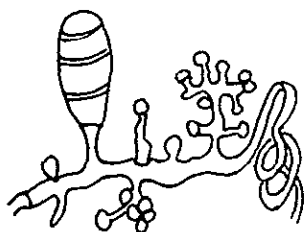
*M. fulvum*

TRICHOPHYTON

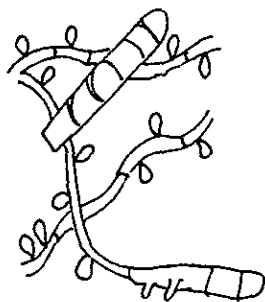


MACROCONIDIAS Y  
MICROCONIDIAS

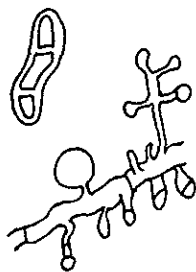
ESPECIES DEL GENERO USADAS EN EL TRABAJO



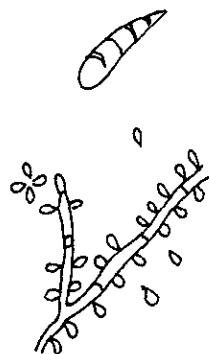
*T. mentagrophytes*



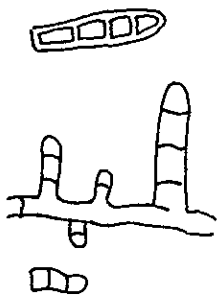
*T. rubrum*



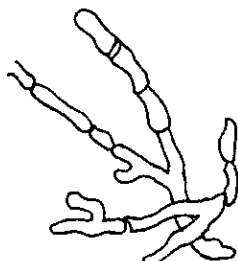
*T. tonsurans*



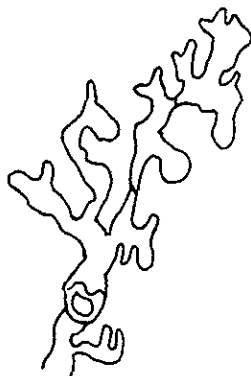
*T. verrucosum*



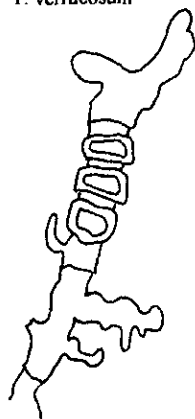
*T. terrestre*



*T. soudanense*

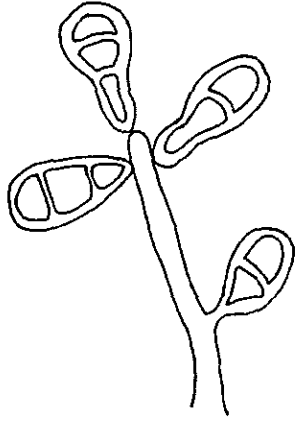


*T. schoenleinii*



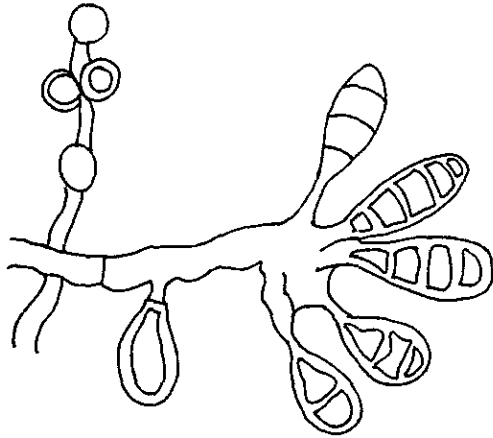
*T. violaceum*

EPIDERMOPHYTON



MACROCONIDIAS

ESPECIE DEL GENERO USADA EN EL TRABAJO



*E. floccosum*

### METODOLOGÍA Y TÉCNICAS

#### 1) MEDIOS DE CULTIVO

Después de un examen en fresco, el espécimen patológico deberá ser cultivado. Como ya se ha explicado, la identificación primaria de los hongos depende del criterio morfológico, por tanto la morfología, color o producción de conidios de la colonia fúngica solo podrá ser demostrada a través del crecimiento en el cultivo. Es recomendable para efectuar, el primo aislamiento del hongo a partir de un producto patológico, utilizar medios de cultivo

Existen medios de cultivo para efectuar el primo aislamiento, los cuales tratan de ser más efectivos al adicionar antibióticos, como penicilina, estreptomina, etc, o tener concentraciones bajas de antifúngicos o modificando el pH con el objeto de inhibir el crecimiento de bacterias u hongos contaminantes.

Es adecuado efectuar la incubación del primo aislamiento a temperatura ambiente. La incubación a 37 °C se recomienda en posteriores cultivos y de preferencia en cultivos puros. Esta temperatura es usada para la obtención de las formas parasitarias. El tiempo de crecimiento variará según el tipo de hongo. Las levaduras se desarrollan en un periodo de 24 a 48 horas después de la siembra, los hongos filamentosos, crecen de 2 a 4 días y, finalmente, la mayor parte de los hongos patógenos crecen después de 6 a 15 días a partir de la siembra.

Muchas veces la sola descripción de la morfología no ayuda a efectuar la determinación de la especie. debido a que se hace necesario conocer características bioquímicas y fisiológicas del organismo, para lo cual se ha desarrollado medios de cultivo especiales para la determinación genérica y/o específica del hongo.

La determinación se logra gracias a los cambios que se producen en el cultivo, según el tipo de desarrollo que tenga el microorganismo en ese medio. Todos los medios de cultivo, a excepción del medio de tioglicolato, deberá ser puestos en refrigeración (16)

#### 2) MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO

##### a) Agar dextrosa - Sabouraud ( Sabouraud simple )

Es un medio utilizado para el aislamiento, identificación y mantenimiento de la gran mayoría de los hongos patógenos. Su composición es la siguiente:

###### Composición

- Peptona 10 gr
- Glucosa 20 gr
- Agar - agar 20 gr.
- Agua destilada 1000 ml

###### Procedimiento:

1. Disuelva los ingredientes en el agua
2. Se deja reposar durante 10 minutos
3. Ajuste el pH a 5.6.
4. Se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C.

Para obtener el medio líquido, deberá de prescindirse del agar.



### 3) MEDIOS QUE FAVORECEN LA CONIDIACIÓN.

#### a) Medio de cultivo de Borelli ( Lactrimel ).

##### Composición:

Harina de trigo	14g
Leche descremada en polvo	14g
Miel de abeja	7 g
Agar	14g
Agua destilada	1000ml

##### Procedimiento:

- 1 Disolver todos los ingredientes en el agua destilada.
- 2 Esterilizar en autoclave 15 min a 15lb. de presión.

#### b) Agar papa - zanahoria

##### Composición:

• Pulpa de zanahoria	20 g.
• Pulpa de papa	20 g.
• Agar	20 g.
• Dextrosa	15 g
• Agua destilada	1000 ml

##### Procedimiento:

1. Macerar la pulpa de la papa y la zanahoria durante una hora.
2. Poner la mezcla en ebullición durante 5 minutos.
3. Filtrar a través de papel filtro y reponer el volumen original.
4. Añadir el agar y fundirlo.
5. Añadir la dextrosa
6. Esterilizar a 120 °C durante 15 minutos.

#### c) Agar sal y avena.

##### Ingredientes.

Harina de avena	10 g.
Pasta de jitomate	10 g
Sulfato de magnesio.	1 g.
Fosfato de potasio	1 g
Nitrato de sodio	1g
Agua ( destilada).	1000 ml.
Agar.	20 g.

##### Procedimiento:

Mezclar todos los ingredientes y calentar hasta ebullición. Enfriar y ajustar el pH a 5.6 con hidróxido de sodio. Poner en autoclave 121 °C / 15 min. Dispensar en cajas petri estériles y adicionar 20 ml de medio por caja.

#### **d) Agar de cereal Pablum.**

##### **Ingredientes**

Pablum ( mezcla de cereales precocidos).	100 g
Cloranfenicol	50 mg
Agua ( destilada )	1000 ml
Agar	20 g

**PREPARACIÓN:** Mezclar todos los ingredientes. Autoclave a 121 °C/15 min.

#### **d) Agar papa-dextrosa.**

##### **Ingredientes:**

*Infusión de papa.	500 ml.
Dextrosa	10 g
Agua ( destilada )	1000 ml
Agar	20 g

**PREPARACIÓN .** Mezclar todos los ingredientes Autoclave a 121 °C/20 min.

\* Pelar y cortar en cubos 200 g de papa blanca , calentar en 500 ml de agua o autoclave a 121 °C/10 min Filtrar a través de varias capas de algodón y restaurar el volumen de 500 ml.

Se inocularon las colonias de los 14 cepas aisladas con 2 semanas en SDA.

Las placas de cultivo fueron incubadas 3 semanas a 25° C en la oscuridad. Las preparaciones de los cultivos se montaron con azul de algodón lactofenol y se examinaron para la presencia de macroconidias.

Los anteriores medios se tomaron del artículo. ( 1 )

## **4) MEDIOS PARA DIFERENCIACIÓN**

### **a) Medio de prueba para dermatofitos ( DTM )**

Se utiliza como medio selectivo para el aislamiento de dermatofitos a partir de muestras muy contaminadas con bacterias u otros hongos. El indicador de pH permite identificar fácilmente a los dermatofitos, pues por el desarrollo de éstos cambia el color amarillo del medio a rojo, debido a la degradación de la fitona y a la liberación de los compuestos alcalinos.

Composición

• Fitona de soya	10 gr.
• Dextrosa	10 gr.
• Agar	20 gr.
• Agua destilada	1000 ml.
• Solución de rojo de fenol al 0.5 %	40 ml
• HCl 0.8 N	6 ml.
• Cicloheximida	500 mg
• Acetona	2 ml
• Sulfato de gentamicina	100 000 U.
• Agua destilada estéril	2 ml.
• Clorotetraciclina	100ml.
• Agua destilada estéril	25 ml
• NaOH 0.1 N	15 ml
• Agua destilada c.b.p.	100 ml

Procedimiento:

1. Disolver 0.5 gr de rojo de fenol en 15 ml de NaOH y aforé a 100 ml con agua destilada
2. Disolver la cicloheximida en 2 ml de acetona
3. Disolver la gentamicina en 2 ml de agua estéril.
4. Disolver la clorotetraciclina en 25 ml de agua estéril.
5. Disolver la fitona, la dextrosa y el agar por calentamiento en 1000 ml de agua destilada
6. Añadir a la mezcla del agar, 40 ml de rojo de fenol al 0.5 %.
7. Homogeneizar y añadir la gentamicina
8. Esterilizar a 12 libras de presión durante 10 minutos.
9. Enfriar a 47 °C y añadir la solución de clorotetraciclina en ambiente estéril
10. Envasar.

**b) Agar Trichophyton ( 1 , 7 )**

Composición

a) Agar 1 ( medio base de caseina sin vitaminas )

• Hidrolizado de caseina libre de vitaminas	2.5 gr.
• Glucosa	40 gr.
• Sulfato de magnesio	0.1 gr.
• Fosfato de potasio	1.8 gr.
• Agar	15 gr
• Agua destilada	1000 ml.

b) Agar 2.

- Agar 1 con 50 mg de inositol.

c) Agar 3.

- Agar 1 con 50 mg de inositol y 200 ug de tiamina.

d) Agar 4.

- Agar 1 con 200 ug de tiamina

e) Agar 5.

- Agar 1 con 2 mg de ácido nicotínico

f) Agar 6 ( medio base de nitrato de amonio sin vitaminas ).

• Nitrato de amonio	1.5 gr.
• Glucosa	40 gr.
• Sulfato de magnesio	0.1 gr.
• Fosfato de potasio	1.8 gr
• Agar	15 gr.
• Agua destilada	1000 ml

g) Agar 7

- Agar 6 con 30 mg de HCl - histidina.

### Procedimiento:

1. Disolver por calentamiento los ingredientes del medio seleccionado.
2. Poner a ebullición durante 1 minuto.
3. Esterilizar a 121 °C durante 12 minutos

## 5) TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE MICROCULTIVO

### a) Cultivo en portaobjetos

Es una técnica de gran utilidad para el estudio de los hongos, se puede emplear para

- a) Identificación taxonómica de hongos.
- b) Estudios de ontogenia de los conidios
- c) Obtención de material para microfotografía y micrografía electrónica
- d) Elaboración de preparaciones permanentes útiles en la enseñanza.
- e) Como apoyo para identificación diferencial
- f) Como control para las cepas de colecciones de hongos.

Los medios de cultivo y tiempos de incubación son variables, dependiendo del hongo por procesar y de los fines que se persiguen al realizar la técnica. En general puede decirse que los medios de cultivo más usados son: agar papa dextrosa, extracto de malta, agar Borelli, agar Sabouraud simple y medio de Czapek. El tiempo de incubación normalmente es de 7 a 15 días y la temperatura habitual es de 25 °C.

### b) Técnica del emparedado

1. Sobre una caja de petri con medio de cultivo, se depositan 5 a 8 fragmentos del hongo por estudiar.
2. Se introducen en el agar de 4 a 6 cubreobjetos esteriles de 22 X 22 mm de un angulo aproximado de 45 °
3. Se cierra la caja y se incuba de 7 a 15 días a 25 °C.
4. Cuando el cultivo ha alcanzado su madurez se retira un cubreobjetos de la caja y se coloca sobre un portaobjetos, sobre el cual previamente se ha depositado una gota de azul de algodón.
5. Se deposita una gota de azul de algodón sobre el cubreobjetos y se cubre con otro cubreobjetos de 24 X 40 mm.
6. Se repite el procedimiento con los demás cubreobjetos contenidos en la caja de cultivo

Con esta técnica se tienen dos planos de enfoque.

### c) Método de Rivalier y Seydel (16)

Es una técnica de microcultivo que permite evidenciar de forma clara las estructuras morfológicas en su arreglo y disposición natural, se realiza para la identificación de cultivos o bien, para preparar material de enseñanza

1. Sumergir un portaobjetos estéril en medio de cultivo a 56 °C
2. Colocar el portaobjetos sobre un caballete en una caja de Petri.
3. Inocular el centro del portaobjetos con el hongo a estudiar.
4. Depositar en la caja de Petri 10 ml de agua destilada estéril, sin mojar el cultivo
5. Incubar a 25 °C en la oscuridad
6. Cuando el cultivo alcance su madurez, desprender el exceso de agar y secar en la estufa a 37 °C durante 24 horas
7. Sumergir la preparación en colodión ligero.
8. Escurrir el exceso de colodión y dejar secar durante 24 horas en posición horizontal.

Preparación del colodión.

- Colodión oficial (sin aceite de ricino) 1 ml
- Alcohol absoluto 2 ml.
- Éter sulfúrico 2 ml

## 6) TÉCNICAS DE TINCIÓN

En micología las técnicas de tinción pueden ser simples, compuestas o especiales para la aplicación en técnicas de histopatología. La elección de la técnica depende del producto que se va a procesar y de la finalidad que se persiga al realizar el procedimiento. Entre las técnicas de tinción más empleadas se encuentran las siguientes:

### a) Azul de Algodón de Lactofenol Clásico.

Es útil para realizar el examen directo de cultivos, ya que es una técnica rápida que permite visualizar las estructuras fúngicas.

La técnica consiste en depositar una gota de colorante sobre un portaobjetos y, sobre ella, colocar un fragmento pequeño de cultivo por estudiar, dilacerándolo perfectamente para poder hacer una buena observación; se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se procede a la observación de la misma.

Esta técnica de coloración se puede aplicar a los microcultivos, en los cuales sólo será necesario aplicar una gota de colorante entre el porta y el cubreobjetos con el hongo.

Con esta técnica también se puede teñir preparaciones para conservación a largo plazo, para esto sólo es necesario sellar los bordes de la preparación con barniz de uñas transparentes.

Fórmula del colorante.

Ácido láctico	20 ml	( Pureza 85-90 % )
Glicerina	40 ml.	( Pureza 99.8 % )
Fenol en cristales	20 g	
Azul de algodón al 1%	2 ml	
Agua destilada	20 ml.	

### b) Azul de Anilina Lactofenol Modificado.

Se utiliza para preparaciones de microcultivos, principalmente de dermatofitos; la técnica consiste en agregar el colorante en el portaobjetos y en el cubreobjetos, de el lado donde se encuentra el crecimiento del hongo, hasta cubrir totalmente el portaobjetos y el cubreobjetos. Se deja la preparación con exceso de colorante por un tiempo de 24 a 48 hrs, para la penetración del colorante a las estructuras fúngicas.

Fórmula del colorante:

Solución A:

Fenol líquido	20 ml.	
Ácido láctico	20 ml	( Pureza 85-90 % )
Glicerol	40 ml	( Pureza 99.8 % )
Agua destilada	20 ml.	

Solución B:

Azul de Anilina	0.5 gr.
-----------------	---------

Procedimiento.

- 1) Si el fenol no es líquido, colocarlo en un matraz en baño María hasta que se funda y mezclarlo con el agua destilada en agitación.
- 2) Adicionar el Glicerol y Acido Láctico a la solución anterior.
- 3) Mezclar la solución B con A y filtrar para eliminar los grumos o precipitados de colorante. ( 16 )

**c) Prueba para Determinar el Tiempo Adecuado de Tinción con Azul de Anilina Lactofenol Modificado.**

La prueba de tinción se realizó cubriendo el cubreobjetos y el portaobjetos con el colorante durante diversos intervalos de tiempo; 1 día, 2 días y 3 días, 3 hrs, 2 hrs y 1 hrs Usando el colorante caliente se probó el siguiente tiempo 5 minutos, 10 minutos y 15 minutos. Después de ver la calidad de las laminillas ( en el cual se observo al microscopio una tinción homogénea y las estructuras bien definidas de los dermatofitos), se eligió el tiempo de coloración 2 hrs , a temperatura ambiente.

**d) Forma de preparación del Balsamo de Canada.**

La resina sintética de la marca Sigma se debe disolver al 60% en xilol o tolueno, para posteriormente ser usado en el montaje de las laminillas obtenidas de los microcultivos.

**e) Fijación de las Laminillas con Bálsamo de Canada.**

Se colocaron con una pipeta Pastear dos gotas del bálsamo en el cubreobjetos y portaobjrtos ya teñidos y se cubrieron con sus respectivos cubreobjetos y portaobjetos limpios. Estos últimos se colocaron en un ángulo aproximado de 45 tocando la resina y soltándolo posteriormente de manera lenta para que ésta se difunda y cubra totalmente la preparación. Se dejó secar durante 24 hrs, para después limpiar el exceso de resina con xilol y alcohol etílico de 96°

# ANEXO # 3

## TABLAS DE TRABAJO:

### a) TIEMPO DE CRECIMIENTO EN AGAR DEXTROSA DE SABOURAUD (EN DIAS), (13)

CEPAS	TUBO	CAJA	MICROCULTIVO
<i>Epidermophyton floccosum</i>	5	7	8
<i>Microsporium canis</i>	6	8	8
<i>Microsporium gypseum</i>	6	7	8
<i>Microsporium fulvum</i>	7	7	8
<i>Microsporium nanum</i>	7	17	8
<i>Trichophyton rubrum</i>	8	10	9
<i>Trichophyton tonsurans</i>	8	7	8
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	8	9	8
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	9	12	11
<i>Trichophyton terrestre</i>	8	9	11
<i>Trichophyton verrucosum</i>	8	15	11
<i>Trichophyton soudanense</i>	9	17	12
<i>T. Trichophyton violaceum</i>	17	17	12

### b) MORFOLOGÍA DIFERENCIAL DE LOS DERMATOFITOS EN SU FASE ASEJUADA IMPERFECTA

<i>Microsporium</i>	<i>Trichophyton</i>	<i>Epidermophyton</i>
Macroconidias fusiformes, ornamentadas, espinosas o de superficie rugosa que miden de 7 a 29 x 30 a 69 micras, generalmente son de pared gruesa hasta de 4 micras.	Macroconidias fusiformes o alargadas de pared lisa, cuyo grosor no excede de 2 micras. Miden entre 4 a 8 x 8 a 50 micras; algunas especies carecen de ellas o son escasas.	Este género monotípico, se caracteriza por sus macroconidias en forma de mazo, con su extremo redondeado y base angosta, sin septo, las cuales miden 6 a 10 x 8 a 15 micras. Produce abundantes clamidiosporas.
Atacan la epidermis y pelos e invaden los folículos pilosos, formando sobre la superficie del pelo una vaina de esporas de 2 a 3 micras de diámetro dando la imagen morfológica típica del ectothrix. Las microsporas se agrupan en "mosaicos" y las hifas que penetran más profundamente forman cerca de la matriz pilosa la banda limitrofe de Adamson	Atacan la epidermis, pelos y uñas. Las especies endothrix pasan desde la epidermis e invaden el interior del pelo, formando cadenas de artrosporas sementadas, mientras que las variedades ectothrix crecen, penetran y además se multiplican sobre el pelo dando el aspecto de pseudosporas grandes, de 3 a 5 micras de diámetro como en <i>T. verrucosum</i> , o bien pequeñas de 2 a 3 micras como <i>T. mentagrophytes</i> .	No ataca al cuero cabelludo, ni los pelos y no forma una vaina de esporas alrededor del pelo, aunque si crece sobre la queratina de la epidermis y en las uñas; tiene preferencia por las zonas húmedas, intertriginosas.
Las microconidias pueden ser sésiles, pedunculadas o fusiformes y miden de 2.5 a 3.5 x 4 a 7 micras.	Las microconidias son escasas o ausentes en algunas especies o pueden ser de forma globosa o piriforme de 2 a 3 x 2 a 4 micras.	No forma microconidias.
Especie tipo: <i>Microsporium audouinii</i> .	Especie tipo: <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	Especie tipo: <i>Epidermophyton floccosum</i> .

c) SE REALIZARÓN CINCO SESIONES EN EL FOTOMICROSCOPIO OLIMPUS COMO EJEMPLO DEL TRABAJO SE DEJA LA 5ª SESIÓN DE TRABAJO EN PREPARACIONES FIJAS PARA OBTENER LAS FOTOGRAFÍAS (EN PAPEL) QUE SE ENCUENTRAN EN EL PRESENTE TRABAJO REALIZADA EL 19 / FEBRERO / 98.

NOTA: LA SESIÓN TUVO UNA DURACIÓN DE 2·45 HRS. Y SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO # EN EL FOTOMICROSCOPIO OLIPUS MODELO #

No. FOTOGRAFÍA	DERMATOFITOS	PREPARACIÓN MUESTRA / DÍA	EXPOSICIÓN
1	T. rubrum	-	1.10
2	"	-	1.10
3	T. terrestre	-	1.02
4	T. tonsurans	macroconidias	1.28
5	"	microconidias	1.78
6	T. rubrum	-	0.92
7	T. verrucosum	-	1.09
8	T. mentagrophytes	microconidias	0.96
9	"	macroconidias	1.52
10	"	macro y microconidias	0.92
11	E. floccosum	-	0.94
12	"	macroconidias	0.80
13	"	-	1.14
14	T. verrucosum	-	1.07
15	T. soudanense	-	1.29
16	T. violaceum	-	0.82
17	"	-	0.83
18	M. fulvum	-	2.70
19	M. nanum	macroconidias	1.34
20	T. schoenleinii	hifas en candelabro fávico	1.34
21	"	-	1.00
22	M. gypseum	macroconidias	1.35
23	"	macroconidias	1.29
24	M. canis	-	2.29
25	"	-	2.84
26	"	-	7.28