

VARIACION EN CEPAS DE MICROSPORUM CANIS Bodin, AISLADAS DE INFECCIONES HUMANAS EN AREAS GEOGRAFICAS LIMITADAS

Eduardo Piontelli L

Universidad de Valparaíso Escuela de
Medicina Cátedra de Micología

Maria Cristina Diaz, J., Lucia Salamanca, F.

Universidad de Chile Facultad de Medicina Sede Oriente
Unidad de Microbiología, Santiago.

& Dunny Casanova, Z.

Universidad de Valparaíso Escuela de Medicina
Departamento de Salud Pública

Palabras clave: *Microsporum canis*, *M. canis* sub.sp. *pulverulentum*, variación en cultivos.

Key words: *Microsporum canis*, *M. canis* sub sp. *pulverulentum*, culture variation.

RESUMEN

En un área geográfica que incluye la ciudad de Santiago y Valparaíso, analizamos 31 cepas de *Microsporum canis* aisladas desde niños prepuberes con dermatofitosis (24 desde cuero cabelludo y 7 de piel), con la finalidad de analizar su variación fenética en 5 medios de cultivo sólidos (Sabouraud, Lactritmel, Papa dextrosa, Czapek y Nitrito sucrosa agar.)

Se seleccionaron 19 características macro y microscópicas, 9 de ellas consideradas de valor taxonómico primario, las que se estudiaron en todos los medios a los 14 días de incubación a 27° C, a partir de subcultivos provenientes de su primer aislamiento clínico.

Los datos obtenidos de los 3 primeros medios de cultivos básicos, se analizaron estadísticamente. Solo se observaron coincidencias en estos 3 medios, al considerar cada parámetro por separado, principalmente: presencia de microconidias (8/31), forma del macroconidio (10/31) y color del reverso (23/31).

El medio que más discrimina es el Sabouraud, al producir las mayores diferencias entre cepas; en segundo lugar Papa dextrosa y, finalmente Lactritmel, que por su menor discriminación permite obtener más agrupaciones. En Agar nitrito de sodio, se apreció la conidiogénesis más estable.

Se determinó la presencia de 2 cepas de *Microsporum canis* sub. sp. *pulverulentum*, situación no registrada anteriormente en nuestro medio ambiente.

SUMMARY

[Variation in strains of *Microsporum canis* Bodin isolated from human infections in limited geographics areas]

In a geographical area that includes both the cities of Santiago and Valparaíso, we studied 31 strains of *Microsporum canis* isolated from prepubescent children having dermatophytosis (24 in scalp and 7 in skin), with the purpose of analyzing their phenetic variation in 5 solid culture media (Sabouraud, Lactritmel, Potato dextrose, Czapek, and Nitrite sucrose).

Seventeen macro and microscopic characteristics were selected, 7 of them considered to have a primary taxonomic value, and they were examined under every media at 14 day incubation and 27°C, based on subcultures from their first clinical isolation.

Data resulting from the first 3 media of basic cultures were statistically analyzed. Coincidences were found only in these 3 media upon considering each parameter alone, mainly: Presence of microconidia (8/31); shape of macroconidia (10/31) and color of reverse (23/31).

The most differing medium is the Sabouraud, because it produces the highest differences among the strains; secondly is Potato dextrose and finally Lactritmel, with due to its lowest differentiation allows to achieve more groupings. The most stable conidiogénesis was seen in Nitrite sucrose agar.

The presence of 2 strains of *Microsporum canis* sub. sp. *pulverulentum*, a situation never observed in our environment, was determined.

INTRODUCCION

La clasificación de los dermatofitos aún se basa principalmente en la aplicación de criterios morfológicos (Sabouraud 1910; Langeron & Milochevitch, 1930; Emmons, 1934; Rivalier, 1966; Rebel y Taplin, 1970; Badillet, 1982), ya sea por las llamadas "escuelas francesas o americanas" (Badillet, 1988). Sin embargo la identificación de algunas especies ha presentado hasta nuestros días, problemas en la interpretación de ciertas diferencias fenotípicas observadas in vitro. Estas, encierran en cierta medida, la expresión de su fase parasitaria, la relación con un determinado tipo de hospedador, o la condición clínica predominante en el momento de su aislamiento (Badillet et al. 1980).

Como comenta Philpot (1977), los sistemas de determinación biológica de las especies micopatógenas del hombre, deben reunir condiciones de simplicidad y especificidad para que sean de utilidad en el manejo diario en el laboratorio micológico. Rutina que al mismo tiempo debe ser capaz de reconocer aquellos aislamientos que presenten un apreciable grado de variación ambiental (macro y microscópica) en los subcultivos, reflejada por una diversidad morfofisiológica estable, que permita estudios morfológicos comparativos con la especie tipo u otros de índole genético, bioquímico o molecular.

Hemos observado en nuestro medio ambiente clínico, que algunos aislamientos de *Microsporum canis*, presentan interesantes diferencias ya sea en: la textura de la colonia, la pigmentación del reverso-anverso, la presencia de sectores pleomórficos, el crecimiento restringido de algunas cepas, la producción de macroconidios atípicos y en la cantidad y presencia de microconidios. A pesar que esta situación ha sido descrita en la literatura internacional (Johnstone & Latouche, 1956; English & Toker, 1978; English, 1979; Badillet et al, 1980), no se ha analizado en nuestro país el cual presenta condiciones ecogeográficas, étnicas y turísticas particulares.

Esta situación, nos indujo primeramente al reestudio de algunos aislamientos mediante el empleo de 5 medios de cultivo de fácil preparación, con diferentes fuentes carbonadas y nitrógenadas, reconocidos para el análisis de características morfofisiológicas útiles en taxonomía. Todo esto con la finalidad de permitir una mejor diferenciación y reconocimiento de las cepas aisladas en relación a: alteración del patrón de crecimiento, mutantes estables y rango de variación fenética de la especie.

MATERIAL Y METDO

Entre los meses de Mayo y Agosto 1992, se estudió el comportamiento de 31 cepas de *Microspo-*

rum canis, aisladas desde pacientes prepúberes en la ciudad de Valparaíso y Santiago, que presentaban micosis cutáneas diversas (24 tinea capitis y 7 tinea corporis).

Los primeros aislamientos fúngicos en estos 31 casos clínicos, se obtuvieron mediante siembras en agar Sabouraud (2% glucosa), más CAF. Las cepas se mantuvieron puras y refrigeradas (-4°C) hasta su posterior procesamiento, por un tiempo no superior a los 60 días.

Los subcultivos se realizaron en 5 medios (por duplicado), en placas de Petri de 12 centímetros de diámetro, 3 de los cuales contenían una fuente de nitrógeno orgánico:

- 1.- Agar Sabouraud con 2% Glucosa (SA)
- 2.- Agar Lactritmel (LAC)
- 3.- Agar Papa dextrosa con 1% Glucosa (PDA)

Los 2 medios restantes, solo contenían una única fuente de nitrógeno inorgánico:

- 4.- Agar Czapek (CZ) con NO₃
- 5.- Agar Nitrito sucrosa (NSA) con la siguiente composición :3g NaNO₂; 1,3g K₂PO₄-3H₂O; 0,5g KCl; 0,5g MgSO₄-7H₂O; 0,01g FeSO₄-7H₂O; 30g Sacarosa; 20g Agar-agar (Frisvald 1981).

Los pH finales de todos los medios se ajustaron en 6,5. Todos los medios, se sembraron en el centro de las placas, con trozos iguales de agar de 0,3 mm de diámetro y 2 mm de profundidad, tomados desde la superficie más esporulada de los 31 cultivos originales. Tal operación se efectuó con una cuchareta quirúrgica esterilizada a la llama. Se incubaron a 27°C (+ -1°) durante 14 días, al cabo de los cuales se efectuó un análisis macroscópico de todas las colonias en los 5 medios y preparaciones entre porta y cubreobjeto (teñidas con Lactofenól y azul de algodón), para el estudio de sus características microscópicas. Para esto, se seleccionaron de los duplicados, las placas con mejor fructificación mediante el empleo de una lupa estereoscópica.

Solo en SA se efectuaron simultáneamente y en duplicado, siembras a 37°C por el mismo período de tiempo, para medir diámetro de las colonias, pigmentación y presencia-ausencia de conidiogénesis a esta temperatura.

Se seleccionaron 17 características macro y microscópicas, de las cuales 7 se consideraron básicas (A) y de valor primario y 10 secundarias (B), tal como se desglosan a continuación:

- A.- (en orden decreciente de importancia)
 1. Diámetro de las colonias (en mm.) a 27°C.
 3. Colonias atípicas consideradas disgónicas.
2. Color del reverso de la colonia.
3. Tipo de rugosidad del macroconidio (a.- Forma

alargada semejante a dedos de guante, de aspecto irregular, b.- granular (equinulada), semejante a pequeñas esferas de diferentes tamaños, c.- intermedia, con prolongaciones y granulaciones entremezcladas).

4. Forma del macroconidio (en 5 categorías, a- Normales (Navicular-obeso), b- cilíndricos, c- fusiformes (aguzados y estrechos), d - intermedios (fusiformes y normales), d - deformes).

5. Tamaño del macroconidio, midiendo la superficie en μm^2 (ancho x largo).

6. Presencia-ausencia de microconidios y cantidad de éstos en 10 campos visuales a 1000x (Por ejemplo: presencia en 1-3 campos solamente = escasos, en 4-6 campos = frecuentes, en 7-10 campos = abundantes).

7.- Textura de las colonias

B.- (Todas las alternativas fueron consideradas de igual valor)

1. Textura de la colonia.

2. Exudado (presente-ausente).

3. Alteraciones en la producción y dispersión del pigmento.

4. Diámetro de las colonias a 37°C.

5. Presencia o ausencia de conidiogénesis a 37°C.

6. Número de septos del macroconidio.

7. Forma del microconidio.

8. Presencia de hifas en raqueta.

9. Presencia de clamidoconidios.

10. presencia de artroconidios.

Las características tipo se compararon entre los medios básicos de cultivo mediante Test t de Student o X², con apoyo computacional para la clasificación y graficación de datos (Harvard Graphicy Microstat).

RESULTADOS

Los resultados de nuestro estudio, derivaron del análisis macro y microscópico de los 5 diferentes cultivos en duplicado, examinando 360 placas de Petri y 155 preparaciones teñidas, obtenidas por las siembras de las 31 cepas clínicas analizadas. La mayoría obtenidos sólo en los 3 medios básicos (SA, LAC y PDA). El medio CZ no permitió registrar datos macro y microscópicos útiles y en NSA, fué posible observar sólo la mayoría de los microscópicos.

Las comparaciones entre pares de medios de cultivo (SA-LAC, SA-PDA y LAC-PDA) para las principales características de valor primario, permitieron establecer que, se asocian mejor entre si los medios de cultivo LAC y PDA. Sólo se observaron coincidencias entre los 3 medios básicos para: presencia de microconidios (8/31), color del reverso (23/31) y forma

del macroconidio (10/31). Sin embargo la estabilidad de las características microscópicas en NSA, debe destacarse.

CUADRO 1
Coincidencias entre SA, PDA y LAC

	Pres. Microcon.	Color	Forma
SA-LAC	45,2%	83,9%	35,5%
SA-PDA	41,9%	80,6%	32,2%
LAC-PDA	38,7%	83,9%	83,9%

1.- Diámetro de las colonias. El diámetro de las colonias no presentó diferencias significativas a 27°C, en SA, LAC y PDA, concentrándose entre valores de 55 a 75 mm (Figura 1). Solo en 5 casos se observaron máximas diferencias entre los 3, pero nunca entre LAC y PDA. En los 3 medios básicos (incluso en CZ Y NSA) se detectaron 2 cepas con crecimiento restringido (menor de 30mm. Fig.1, Figura 2, n°4). Estas eran de aspecto ceroso, surcadas en el centro y en la periferia, con escaso micelio aéreo, presencia de cordones de hifas sumergidas normales pero con algunas ramas y ápices de crecimiento reflexo y colonias de bordes irregulares. Estas fueron consideradas como cepas semidisgónicas o disgónicas parciales.

En CZ y NSA los diámetros fueron bastante similares a los registrados en los medios básicos, aunque con una leve tendencia a ser mayores. Sin embargo en ambos medios el micelio vegetativo fué pobre (y muy escaso el aéreo), dificultando la observación de los límites de la colonia. Por tal motivo no fueron de utilidad para determinar textura y exudado. A 37°C. (solo en SA), las colonias fueron de diámetro más reducido (30 a 45 mm promedio)

2.- Color del micelio aéreo y pigmentación del reverso de la colonia. El micelio aéreo en SA y PDA presentó tonos pálidos, pero debido al pigmento difusible en el medio (amarillo-naranja), visualmente se apreciaron tonalidades más fuertes, casi semejantes al reverso. En LAC, en cambio, debido a su intensa esporulación, los tonos fueron más claros (blanco-crema), además, al color blanquecino del medio permite translucir escasamente los colores del reverso.

El color del reverso de las colonias fué similar en los 3 medios básicos, con tonos amarillo-brillante a amarillo naranja - predominante en LAC-, con algunas tonalidades del café en el centro de las colonias, especialmente en SA. Solamente en SA se presentó una dispersión del pigmento difusible en un 25% de las cepas. (Fig.2 n°3)

Solo 2 cepas no presentaron pigmento difusible

(tonos pálidos), el color del micelio aéreo se mantuvo con tonalidades cercanas al blanco y la textura de aspecto pulverulento (Figura 2 n°2). Estas características se mantuvieron en los 3 medios básicos y en posteriores subcultivos. Debido a esto y por la producción constante de microconidios, se consideraron mutantes estables, clasificándose como *M. canis* sub sp. *pulverulentum*, acorde a la escuela francesa.

En CZ y NSA no hubo producción de pigmento en ninguna de las cepas estudiadas y el color del micelio vegetativo, fué siempre hialino.

3.- Tipo de rugosidad del macroconidio.

La mayor variación de la rugosidad de la pared del macroconidio se observó en SA, donde un 35% de las cepas presentó una rugosidad intermedia (de forma granular y alargada semejante a dedos (Figura 3 n°2-3), un 29% la forma alargada principalmente y solo un 19% la forma granular (aspecto clásico). Debe destacarse que fué difícil ubicar en un determinado grupo el tipo de rugosidad en SA, por la variabilidad que presentaba la superficie del macroconidio de una misma cepa. En algunos aislamientos en SA, esta rugosidad se extendía a lo largo de la hifa conidiógena, lo que dificultaba su delimitación. Esta situación se observó también en SA, en las 2 cepas semidisgónicas, las cuales presentaron macroconidios con rugosidades principalmente alargadas y entremezcladas. En LAC y PDA, fueron más cortas y en NSA no hubo producción de macroconidios.

En LAC, PDA y NSA, la rugosidad fué mayoritariamente de tipo granular en porcentajes de 77, 87 y 74% respectivamente. Algunas cepas en LAC y PDA, presentaron macroconidios de aspecto liso o solo con una leve rugosidad en su ápice (Figura 3 n°7), situación que no se observó en NSA. En CZ, no hubo prácticamente desarrollo de macroconidios.

4.- Forma del macroconidio. La forma navicular clásica se presentó mayoritariamente en LAC y PDA (Fig 3 n° 7, Fig. 5), mientras la intermedia se presentó con mayor frecuencia en SA (en este medio 6 cepas no produjeron macroconidios, Figura 5). Estas diferencias son altamente significativas ($P < 0,001$).

En algunos aislamientos en SA la forma lanceolada (aguzada en su punta (Figura 3 n° 2-3) se presentó con frecuencia, semejando a los macroconidios de *M. praecox*. En SA, en general, se apreció un menor desarrollo conidiógeno, debido a la presencia de mayor cantidad de propágulos inmaduros (macroconidios). En NSA, la forma normal (navicular clásica) fué dominante, presentando gruesas paredes (Figura 3 n°10). La presencia de macroconidios predominantemente

cilíndricos y con extremos redondeados, solo se presentó en la misma cepa en PDA y en una cepa en LAC, la cual catalogamos como intermedia (Figura 3 n°6-9).

6.- Presencia-ausencia y cantidad de microconidios. La presencia-ausencia de microconidios no difiere significativamente entre SA, LAC, PDA y NSA (Fig. 7). El medio NSA tampoco difiere de los anteriores. Sin embargo cuando hubo presencia de éstos, en PDA fueron más abundantes y en SA menos. (Fig 6). En NSA, algunas cepas presentaron entre sus microconidios clavados, algunos con un septo bien visible.

7.- Textura. En SA, fué predominante el aspecto lanoso, con fascículos de hifas y la presencia (a veces) de sectores pleomórficos en la colonia, mientras que en LAC y PDA, se presentaron más de aspecto aterciopelado en la periferia y lanoso en el centro. (Fig 2 n° 1). A 37°C en SA, la textura fué de aspecto ceroso, estriada, con reducido micelio aéreo y fructificación casi nula.

Características secundarias. Los otros caracteres secundarios considerados en la metodología, se presentaron en forma esporádica en los diferentes medios, por lo cual no se pudieron evaluar estadísticamente. Cabe destacar que la mayor producción de arthroconidios se observó en NSA (Fig 3 n°8) y LAC. En el primero, fueron abundantes y característicos, algunas veces de paredes gruesas.

DISCUSION

Los 3 géneros clásicos descritos por Emmons (1937), se aceptan prácticamente por todos los micólogos médicos, sin embargo la existencia de especies saprotrofas y biotrofas, no ha permitido cuantificar en estos últimos, la plasticidad de su fenotipo y genotipo, causada por la relación hospedador-parásito, e influenciada por diversos factores tales como: los climáticos, de competencia, el tipo o raza de hospedador, el estado de sus defensas, sus hábitats naturales, u otros que en mayor o menor medida inducen cambios adaptativos en las especies patógenas o potencialmente patógenas del hombre y los animales. Esta situación ha sido enfocada en alguna medida por English & Tucker (1978), English (1979) y Badillet et al. (1980). Por este motivo, la diversidad morfológica en los taxa, no solo

FIGURA 1
DIAMETRO DE LAS COLONIAS (mm) A 27°C. EN SA, LAC Y PDA

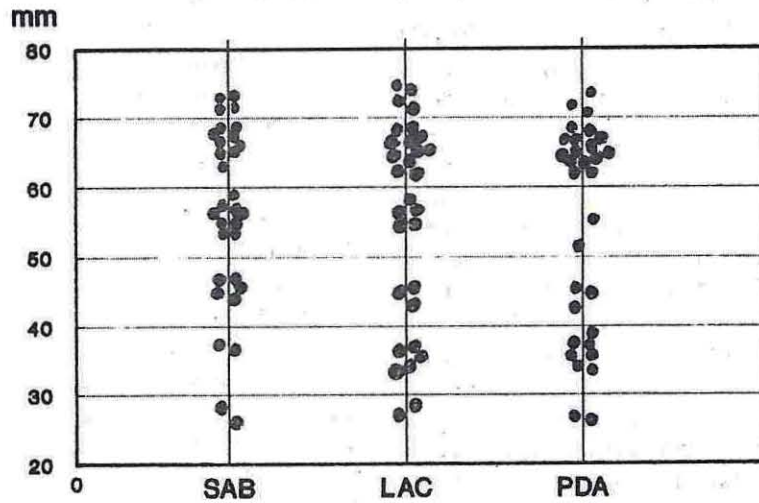
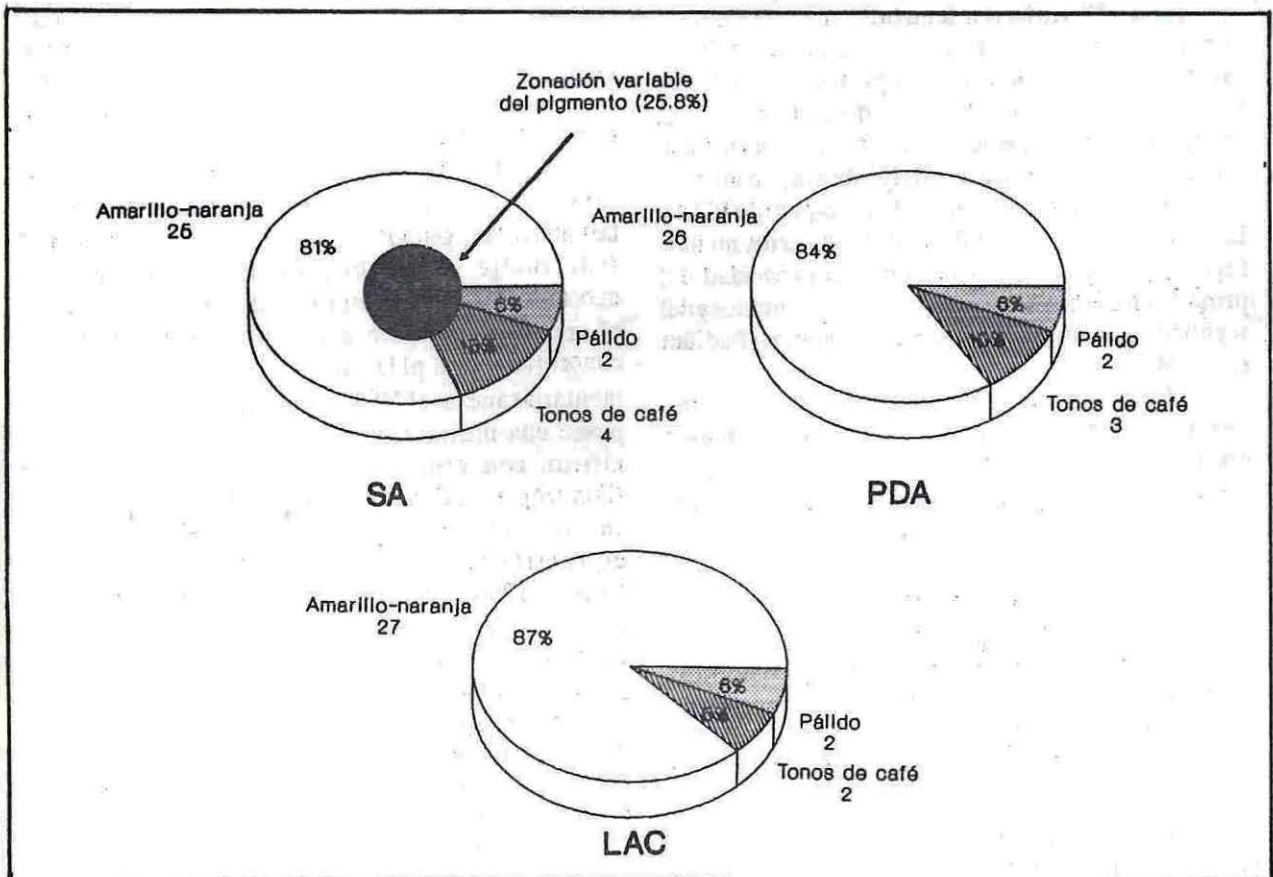


FIGURA 4
COLOR REVERSO DE LAS COLONIAS EN LOS 3 MEDIOS BASICOS



debe relacionarse con la taxonomía, sino estrechamente con la ecología y la epidemiología (Badillet 1988, De Hoog et al.1991).

El estudio de los microhongos en diversos medios de cultivo artificiales, se considera ampliamente en la taxonomía de estos organismos. Si analizamos la frase de Jennings (1987), "el medio es el mensaje", veremos que ésta no solo engloba el reconocer la competencia por el sustrato en términos de concentraciones de sus principales fuentes (C y N), sino considerar la presencia de otros microelementos que puedan influenciar, en mayor o menor medida, la síntesis de metabolitos secundarios útiles en la expresión de caracteres morfo-fisiológicos. Por esto debe considerarse el crecimiento fúngico y su expresión en cultivos, sin descuidar el análisis y la cuantificación de ciertos factores fisiológicos capaces de alterarlo. De esta manera es posible conocer en cierta medida su desempeño en los medios naturales, frente a una alta competencia nutricional (Paustian & Schnürer, 1986 en Jennings 1987).

Si la morfología en cultivo es una expresión útil para apreciar la variación dentro del rango de especie y por ende permite la descripción de taxa infraespecíficos, ésta debe ser analizada desde su primer aislamiento y en posteriores subcultivos, considerando no solo el aspecto de morfoespecie, sino también la relación con el cuadro clínico existente o el tipo de hospedador.

Es ampliamente conocido el empleo de PDA y LAC en el estudio de los dermatofitos y estos medios fueron seleccionados conociendo la capacidad del primero en estimular la producción de pigmentos y del segundo, en la producción de macroconidios (Badillet et al 1980)

En LAC y PDA, pudimos apreciar en general, una estable macro y micromorfología, la mayor producción de macroconidios y la mejor estabilidad en la producción de pigmentos; pero, el agar Sabouraud y agar Nitrito Sucrosa, deben considerarse en forma especial.

En el medio SA se apreciaron las mayores alteraciones en cultivo, principalmente: presencia de algunas cepas disgónicas parciales, zonas pleomórficas en algunos sectores de las colonias, un menor ciclo de desarrollo en el tiempo, un menor tamaño de los macroconidios, alteraciones en su rugosidad, el mayor número de cepas sin fructificar y una dispersión no uniforme del pigmento difusible. Todo esto induce a pensar en variación, la que no se expresa en igual medida en las mismas cepas cultivadas en los medios básicos (LAC y PDA), como también parcialmente en NSA.

En NSA, las alteraciones micromorfológicas no

son evidentes como en SA, al parecer se observa una tendencia hacia la reducción de la presión ecológica del hospedador, destacándose las características ancestrales silvestres de la especie, con una reducida pero uniforme producción de propágulos de dispersión (Micro, macro y arthroconidios).

Nuestros resultados en relación a la reducción de nitritos como única fuente de N, fueron hasta cierto punto inesperados. Desconocíamos la capacidad de *M.canis* frente a una concentración relativamente alta de NO₂; pensábamos apreciar diferencias en la capacidad de desarrollo de las cepas, que permitieran algún tipo de separación en grupos. Sin embargo todas pudieron reducirlo.

El nitrito es utilizado como fuente de N por algunos hongos telúricos, sin embargo es tóxico para algunas especies por la aparente habilidad de desaminar los aminoácidos o por su interferencia en el metabolismo del azufre, (Pateman & Kinghorn 1976). Malincowsky & Ottow (1984,1985), postulan que la reducción de nitritos puede actuar como un mecanismo que permite evitar en los hongos el efecto tóxico del ión. El crecimiento escaso de *M.canis* en presencia de nitritos puede deberse en parte a la concentración de éstos, al efecto del pH y a la actividad de su nitrito reductasa. Una situación similar es analizada en el género *Penicillium* por Bridge (1987).

El test de asimilación de nitritos, es una característica empleada en algunos esquemas taxonómicos en geohongos por algunos autores (Frisvald 1981, Bridge et al. 1986). En nuestros resultados, deberá corroborarse a futuro, si existen alteraciones en el crecimiento frente a los nitritos a diferentes concentraciones, pH, o frente a otras fuentes suplementarias anexas al NO₂. Desconocemos si *M.canis*, posee una nitrito reductasa ligada a la vía nitrato-nitrito, con producción final de amonio o N₂ (Dinitrógeno). Este último elemento es importante en los suelos ácidos, por su acción como una fuente de energía respiratoria para los denitrificadores (Adams 1986). La completa reducción a N₂, es un proceso de ambientes con poca tensión de oxígeno y de acceso a pocos organismos. Como la dermis presenta ambientes microaerófilos y pH ácido, no debe descartarse la posibilidad que *M.canis*, represente un organismo metabólicamente muy versátil y con una alta estrategia de adaptación, situación conocida por su capacidad de infectar diversos hospedadores.

La asimilación de nitratos en CZ, fué también positiva para todas las cepas, con un desarrollo, del talo similar al experimentado en NSA. La escasa o nula esporulación obtenida, concuerda con lo descrito por Calvo et al. (1986), en otro dermatofito zoofílico cultivado en el mismo medio, como *Trychophyton*

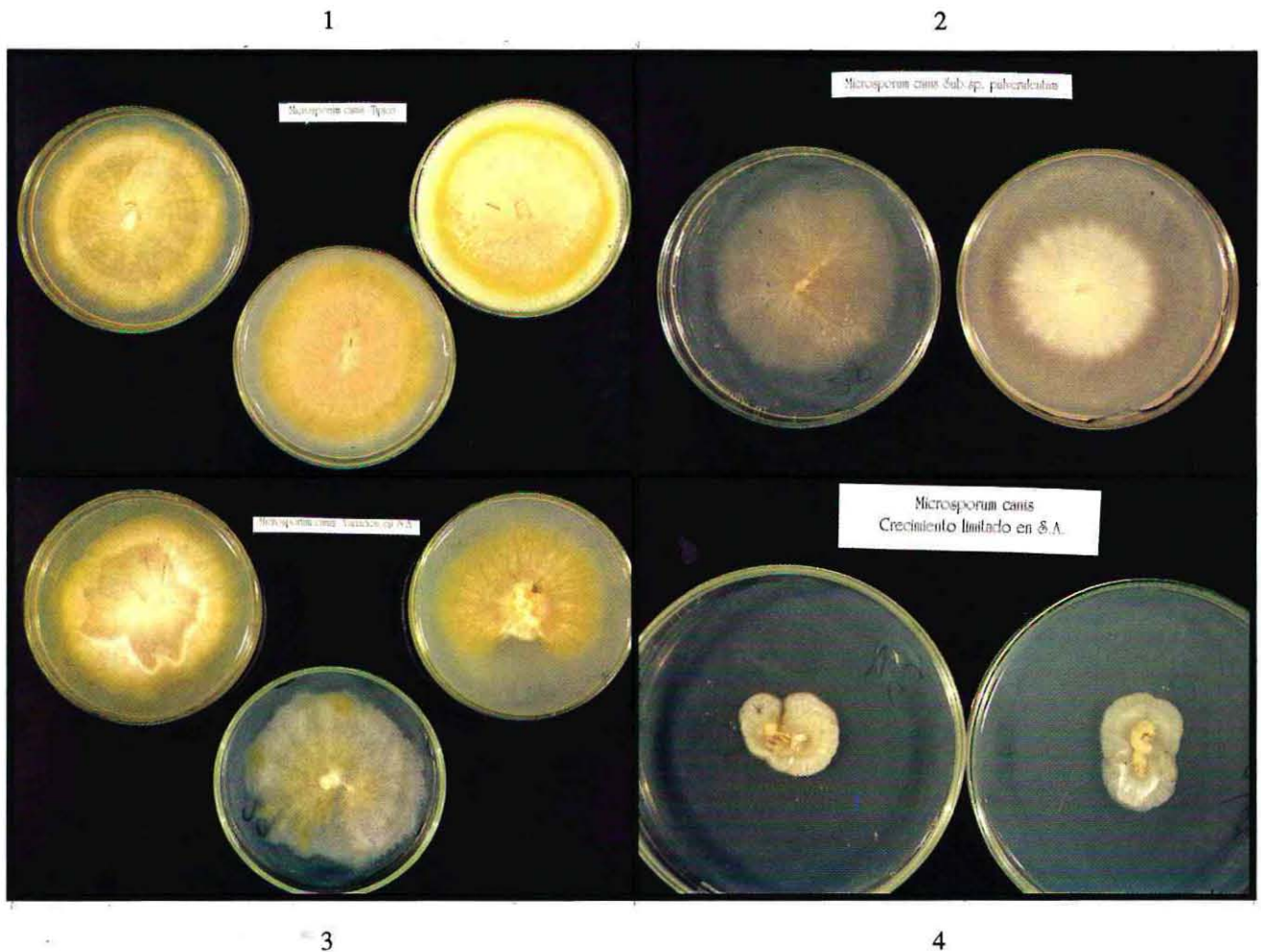


Figura 2. 1.- Aspecto típico de *Microsporium canis* en SA, PDA y LAC. 2.- *M.canis* sub.sp. *pulverulentum*, reverso y anverso de la colonia en SA. 3.- *M.canis* en SA, alteración en la difusión del pigmento. 4.- Crecimiento restringido de *M.canis* en SA (Cepas semidisgónicas).

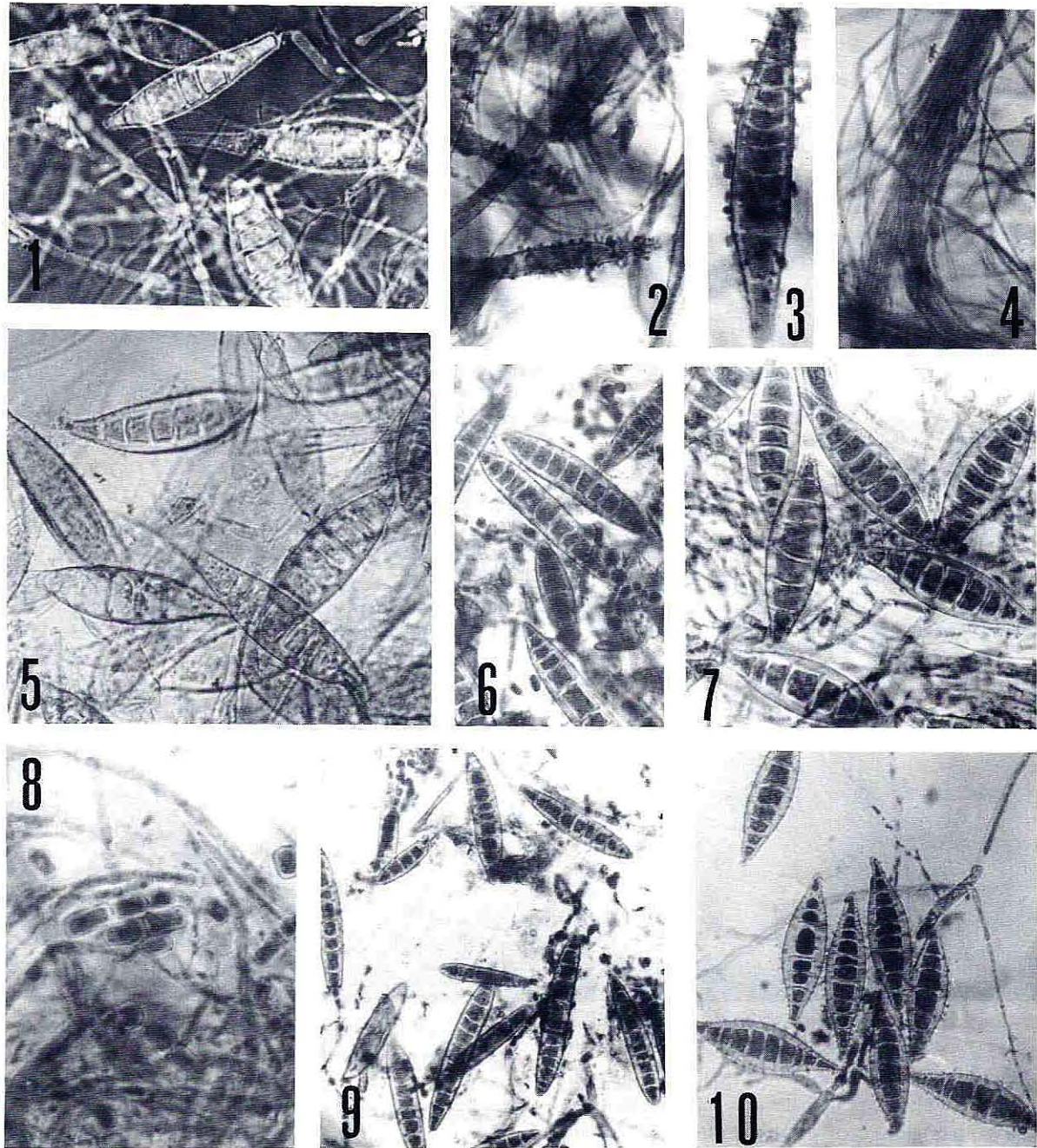


Figura 3. (1 al 10 *M.canis*) 1.- Macroconidios típicos en SA. 400x. 2-3.- Rugosidades superficiales y macroconidios fusiformes (lanceolados) en SA, 250y800x. 4.- Cordones de hifas en SA.400x. 5.- Macroconidios en LAC, con escasa rugosidad en sus paredes, algunos con lisis interna, 800x. 6.- Macroconidios de aspecto cilíndrico y sin rugosidad en LAC, 250x. 7.- Macroconidios normales en LAC, con leve rugosidad en sus extremos apicales, 800x. 8.- Arthroconidios de paredes gruesas en NSA, 1000x. 9.- Macroconidios cilíndricos en PDA, 200x. 10.- Macroconidios de gruesas paredes y rugosidad de tipo granular en NSA,400x.

FIGURA 5
FORMAS DEL MACROCONIDIO EN SA, LAC Y PDA

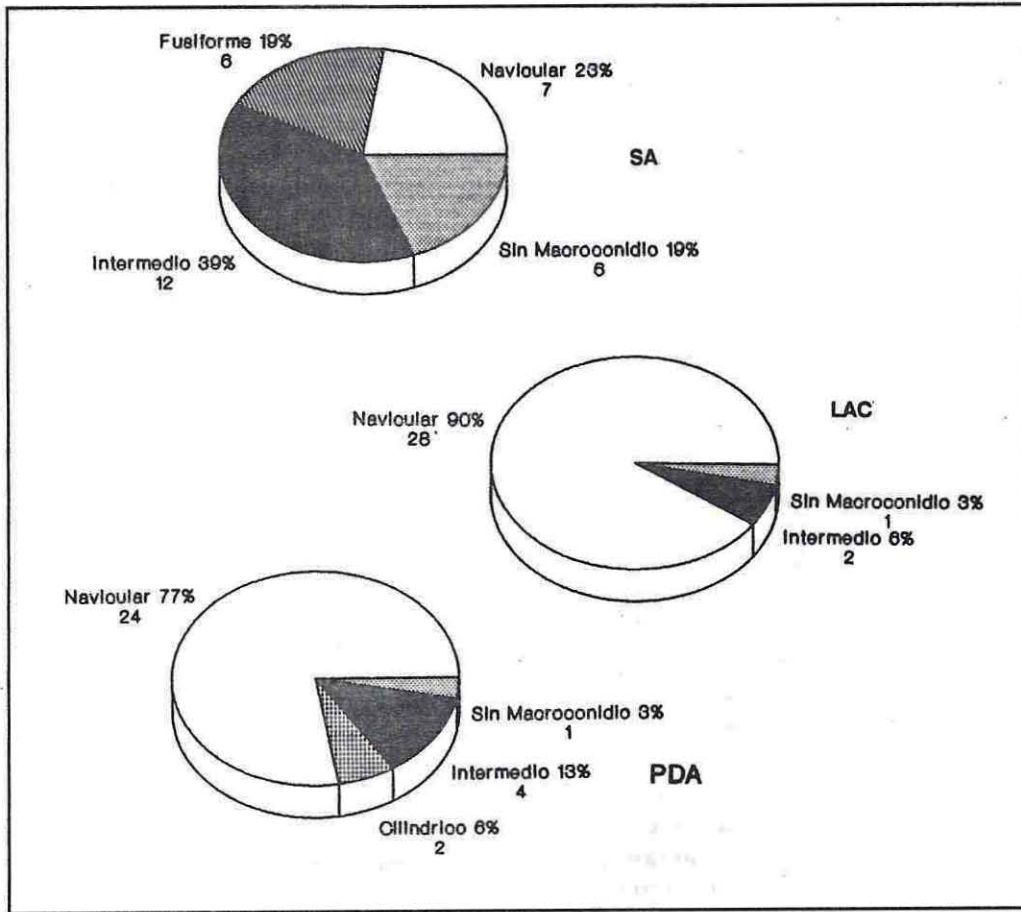


FIGURA 6

TAMAÑOS DE MACROCONIDIOS (μm^2) EN SA, LAC Y PDA

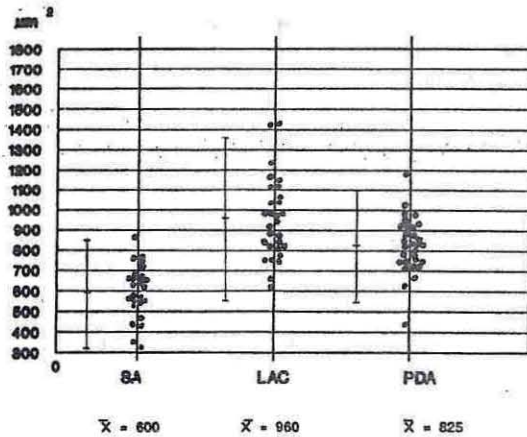
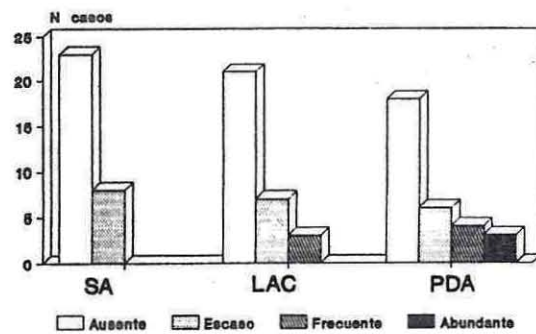


FIGURA 7

PRESENCIA DE MICROCONIDIOS EN SA, LAC Y PDA



mentagrophytes.

Guého y Badillet (1983-84, 1985), al estudiar por microscopía electrónica las ornamentaciones superficiales del macroconidio en el género *Microsporium*, describen III tipos de éstas, en 3 diferentes grupos de especies. El tipo I, representado por *M. audouinii*, incluye el mayor número de especies del género, así como *M. canis*, y la sub. sp. *pulverulentum*. Mayoritariamente en SA y a 1000 aumentos, pudimos apreciar sin dificultad el aspecto alargado de las rugosidades descritas en este grupo, pero a veces éstas se presentaron entre mezcladas con otras de aspecto granular (grupo III, correspondiente a *M. persicolor*). Este tipo de ornamentación se había descrito con anterioridad por Klokke & De Vries (1963) y English & Tucker (1978), en aislamientos que presentaban macroconidios anormales.

En LAC, PDA y NSA, mayoritariamente se presentaron ornamentaciones referidas como de tipo equinulado o, rugoso, esféricas a subglobosas y uniformes en tamaño, correspondientes al grupo II (*M. fulvum*). Esporádicamente en LAC y PDA observamos el tipo I, pero nunca este tipo se presentó en NSA. Este cambio morfológico puede atribuirse a la composición de los medios empleados. Como estas alteraciones se expresan mayoritariamente en SA, debe considerarse este aspecto en su empleo para no describirlas como anómalas.

Los cultivos en NSA y PDA, presentaron también producción variable de arthroconidios en cortas o largas cadenas; su formación se ha correlacionado a estados nutricionales, rangos de crecimiento, o tensión de CO₂ y O₂ (King et al, 1976, Kier et al, 1976). Sin embargo Emianitoff y Hashimoto (1979), concluyen que en *T. mentagrophytes*, la formación de éstos, se aprecia a bajos rangos de crecimiento y en condiciones que promuevan la inhibición de la extensión apical en las hifas, pero sin afectar los procesos metabólicos generales, situación que seguramente puede atribuirse a su crecimiento en medios pobres (PDA y NSA), como también a las condiciones encontradas a nivel de la piel y sus anexos, lo que induce a su exclusiva formación en los tejidos del hospedador. La presencia de arthroconidios en los cultivos de *M. canis*, no representa un carácter de importancia taxonómica, pero su relación con características nutricionales y a patrones de crecimiento, debe asociarse al grado de adaptación parasitaria.

Con respecto a la detección de mutantes estables: pudimos aislar 2 cepas de *M. canis* sub. sp. *pulverulentum*, 2 cepas semidisgónicas, así como la detección de un cierto grado de variación ambiental en otras. La diversa procedencia de hospedadores (humanos o animales domésticos), exige una rápida respuesta adaptativa, manteniendo generalmente una

maxima competitividad y aptitudes de sobrevivencia en las especies. Ante esta situación, que bien podemos llamar estabilidad intrínseca, las especies sufren cambios lentos, que se expresan en cultivo como una respuesta a la modificación de su nicho ecológico. Varios aislamientos atípicos en SA, presentaron una parcial o total reversión a la forma normal en los otros medios básicos, en forma similar a lo descrito por English & Tucker (1978) y English (1979). Debido a esto, consideramos más importante el análisis detallado de los subcultivos, que de los aislamientos primarios, situación que en cierto modo evita la inestabilidad inicial de algunas cepas atípicas de *M. canis* en SA (English, 1979). A pesar que nuestro tiempo de incubación no se prolongó por más de 14 días, estos fueron suficientes para, apreciar la variabilidad dentro de la especie.

El polimorfismo (incluyendo el pleomorfismo) en cultivo observado en algunas cepas de dermatofitos en SA, es aún un problema en el diagnóstico micológico clínico, porque corresponde a un medio aún muy rico en elementos nutritivos (a pesar de su menor cantidad de glucosa al 2%). La reducción a 1/10 de sus componentes propuesta por Takashio (1973), se considerará como una de las alternativas para nuevos estudios morfológicos y genéticos en estos microorganismos, por su capacidad de rejuvenecimiento sobre las cepas.

CONCLUSIONES

En agar Sabouraud las cepas presentaron una mayor inestabilidad y variación de sus características macro y microscópica, mientras en LAC y PDA, éstas fueron menores. Esta situación puede inducir a errores determinativos y solo debe describirse como aislamiento atípico, aquel que en diversos medios de cultivo de diagnóstico mantiene sus características relativamente estables en el tiempo.

Los 3 medios básicos en conjunto, permiten un mejor análisis del fenotipo de la especie y debieran emplearse en forma rutinaria para estudios taxonómicos. La presencia de cepas semidisgónicas fué escasa y en SA presentaron una mayor variación.

La presencia o ausencia de pigmento fué una de las características útiles en la selección de cepas en los 3 medios básicos, pero en SA se presentaron alteraciones en la difusión. La ausencia de éste, fué una de las características primarias en la descripción de *M. canis* sub. sp. *pulverulentum*.

En LAC, PDA, y NSA, se apreció una estable morfología del macroconidio que en SA, donde se observaron características aberrantes en su forma, rugosidad y un menor grado de desarrollo de sus

estructuras conidiógenas en el tiempo. Debido a esta situación, en el estudio taxonómico de los dermatofitos deben emplearse medios de cultivos que reduzcan la variación y su pleomorfismo.

La metodología empleada permitió en buena medida el análisis de los objetivos estipulados, sin embargo, el rango de variación dentro de la especie

en nuestra área geográfica limitada, necesita de mayores datos fisiológicos, bioquímicos y genéticos, que permitan la selección de taxa infraespecíficos en el complejo *M. canis*,

Los resultados obtenidos en la utilización de nitritos en NSA, como una única fuente de nitrógeno, merecen futuros estudios para poder considerar este medio de utilidad para aportes morfofisiológicos.

REFERENCIAS

- Adams, J. A. (1986). Identification of heterotrophic nitrification in strongly acid larch humus. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 339-341
- Badillet, G. (1982). *Les Dermatophytes, Atlas clinique et biologique*. Ed. Variá. Paris
- (1988). Taxonomic study of dermatophytes following the french school. X International Congress of Mycology. Barcelona España. pp. 328-333
- , Pietrini, P., David, V. & Panagiotidou, D. (1980). Polimorphisme clinique et biologique de *Microsporium canis*. *Bull. Soc. Mycol. Méd.* 9: 209-214
- Bridge, P. D., Hawksworth, D. L., Kozakiewicz, Z., Onions, A. H. S., Paterson, R. R. M. & Sakin, M. J. (1986). An integrate approach to *Penicillium* systematics. In: Samson, R. A. & Pitt, J. I. (Eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. New York Plenum. pp. 281-309
- (1987). A note on use and interpretation of nitrite assimilation test in *Penicillium* systematic. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88: 556-571
- Calvo, M. A., Trabe, J., Abarca, L., Cabañes, F. J., Calvo, R. M. & Bruguera, T. (1986) Variability of biochemical characteristics in strains of *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopathologia* 93: 137-139
- De Hoog, G. S., Gueho, E. & Boekhout, T. (1991) Experimental fungal taxonomy In: Arora, D. K. et al. (Eds.). *Handbook of applied Mycology* (Vol. 2) Marcel Dekker Inc. New York pp. 369-394
- Emmons, C. W. (1934) Dermatophytes, natural grouping based on the form of the spore and accessory organs. *Arc. Derm. Syph. (Chicago)* 30: 337
- Emyantoff, R. G. & Hashimoto, T. (1979). The effects of temperature, incubation atmosphere and medium composition on arthrospore formation in the fungus *Trichophyton mentagrophytes*. *C. J. Microbiol.* 25: 362-366
- English, M. P. (1979). The disgonic strain of *Microsporium canis*. *Mycopathologia* 64: 73-81
- & Tucker, D. L. (1978) Atypical strains of *Microsporium canis*. *Mycopathologia* 63: 113-120
- Frisvald, J. C. (1981). Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. *Appl. and Envir. Microbiol.* 41: 568-579
- Guého, E. & Badillet, G. (1984-84). Scanning electron microscopy on *Microsporium audouini* complex. *Mycopathologia* 84: 133-140
- (1985). L'ornementation macroconidienne du genre *Microsporium* en microscopie électronique a balayage. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.* 14: 57-62
- Jennings, D. H. (1987). Presidential address: The medium is the message. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89: 1-11
- Johnstone, K. I. & Latouche, C. J. (1956) Cultural characteristics of dysgonic strains of *Microsporium canis* Bodin. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 39: 442-448
- Kier, I., Allerman, M., Fluoto, F., Olsen, J. & Sortkjaer, O. (1976). Changes of exponential growth rates in relation to differentiation of *Geotrichum candidum* in submerged culture. *Physiol. Plant.* 38: 6-12
- King, R. D., Bilavou, C. L., Greenberg, J. H., Jeppsen, J. L. & Jaegar, J. S. (1976). Identification of carbon dioxide as a dermatophyte inhibitory factor produced by *Candida albicans*. *C. J. Microbiol.* 22: 1720-1727
- Klokke, A. H. & De Vries, G. A. (1963). Tinea capitis in chimpanzees caused by *Microsporium canis* Bodin 1902, resembling *M. obesum* Conant 1937. *Sabouraudia* 2: 268-270
- Langeron, M. & Milochévitch, S. (1930). Morphologie des dermatophytes sur milieux naturels et milieux à base de polysaccharides. *Essay de classification*. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 8: 465
- Malinowsky, P. & Ottow, J. C. G. (1984). Conditions of N₂O release (denitrification) by fungi in batch cultures. *Proceedings of the 3rd. European Congress of vBiotechnology* 3: 17-21
- (1985). Ecological conditions for denitrification with fungi. *Landwirtschafliche Forschung* 38: 115-121
- Pateman, J. A. & Kinghorn, J. R. (1976). Nitrogen metabolism. In: *The filamentous fungi Vol. 2, Biosynthesis and metabolism* (Smith, J. E. & Berry, D. R. Eds.). Academic Press. London. pp. 159-237
- Paustian, K. & Schmürer, J. (1986). A model of fungal growth response to carbon and nitrogen limitation. I. Theory. *Soil Biology and Biochemistry* In: Jennings, D. H. (1987).
- Philpot, C. M. (1977) The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. *Sabouraudia* 15: 141-150
- Rebell, G. & Taplin, D. (1970). Dermatophytes, their recognition and identification. Univ. Miami. Coral Gables.
- Rivalier, E. (1966). Sur la taxinomie des dermatophytes. *Ann. Inst. Pasteur* 110: 877-887
- Sabouraud, R. (1910). *Les teignes*. Mason Ed. Paris
- Takashio, M. (1973). Etude des phénomènes de reproduction liés au vieillissement et au rejuvenissement des cultures de champignon. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 53: 427-580