

Determinación de actividades enzimáticas en cepas de *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum*

M^a Teresa Bruguera, M^a Lourdes Abarca, M^a Rosa Bragulat y Francisco Javier Cabañes

Departamento de Patología y Producción Animales, Unidad de Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España

Resumen

Se ha estudiado la presencia de 11 actividades enzimáticas siguiendo métodos cualitativos y 19 enzimas utilizando el método semicuantitativo API ZYM[®], en cepas de *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum*. Entre las dos especies estudiadas no se observan marcadas diferencias con respecto a las actividades enzimáticas estudiadas por los métodos cualitativos y semicuantitativos, aunque algunas de ellas se detectan con más intensidad en *Microsporium gypseum*.

Palabras clave

Actividades enzimáticas, API ZYM[®], *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*.

Enzymatic activities of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum* strains

Summary

The presence of 11 enzymatic activities, detected by qualitative methods, and 19 enzymes, semi-quantitatively detected by API ZYM[®] system, in strains belonging to *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum* has been studied. No pronounced differences were noted between *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*, although *Microsporium gypseum* presented in some cases more intense enzymatic activities than *Microsporium canis*.

Key words

Enzymatic activities, API ZYM[®], *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*.

Desde hace muchos años, las actividades enzimáticas de los hongos dermatofitos han sido objeto de estudio de diversos autores. Así, ya en 1907, Bodin [1] determinó dentro de las posibilidades de la época dicha capacidad en *Achorion gypseum*. Con el avance de la tecnología, los investigadores han estudiado los enzimas desde el punto de vista de patogenicidad [2-7] y se han utilizado también como criterio para la ayuda en la clasificación e identificación de dichos hongos [8-14].

En este grupo de hongos quizás el ensayo más utilizado sea el de la determinación de la hidrólisis enzimática de la urea, de gran valor para distinguir las especies *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* [15].

En el presente trabajo se estudian 11 actividades enzimáticas utilizando métodos cualitativos, así como, la presencia de 19 enzimas siguiendo el método semicuantitativo API ZYM[®], en cepas de dermatofitos pertenecientes a *Microsporium canis* y al complejo *Microsporium gypseum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas ensayadas. En la realización de este estudio se han utilizado 49 cepas pertenecientes al género *Microsporium* y concretamente a dos especies: *M. canis* (26 cepas) y complejo *M. gypseum* (23 cepas). De ambas especies se han incluido cepas procedentes de procesos de dermatofitosis humanas y animales, incluyendo cepas aisladas de suelos en el caso de *M. gypseum*. Algunas de las cepas utilizadas fueron aisladas en nuestro laboratorio y otras facilitadas por centros asistenciales españoles.

Las cepas se sembraron periódicamente en tubos de agar glucosado de Sabouraud al 4% (AGS) y se mantuvieron a 4°C para su conservación.

Actividades enzimáticas y enzimas detectados.

Métodos cualitativos. Se han estudiado un total de 11 actividades enzimáticas siguiendo métodos cualitativos. Las metodologías utilizadas para detectar las actividades amilolítica, desoxirribonucleásica, fosfatásica, lipolítica, proteolítica y ribonucleásica han sido las descritas por Hankin *et al.* [16]. Las actividades catalásica y oxidásica han sido ensayadas siguiendo los métodos citados por Cowan *et al.* [17]. La actividad celulolítica ha sido estudiada mediante una modificación del método de Booth [18]. Las actividades pectolíticas (pH 7 y pH 5) se han ensayado mediante el método de Hankin *et al.* [19]. En la actividad ureásica se han seguido las metodologías de Hankin *et al.* [16] y Christensen [20].

Método semicuantitativo. Para realizar este ensayo se utilizó el método API ZYM[®], que permite la detección semicuantitativa de los siguientes enzimas: Fosfatasa alcalina

Dirección para correspondencia:

Dr. Francisco Javier Cabañes, Departamento de Patología y Producción Animales, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, España.
Tel.: (+34 3) 581 1749, Fax: (+34 3) 581 2006
E-mail: F.J.CABANES@CC.UAB.ES

Aceptado para publicación el 26 de mayo de 1997

lina, Esterasa, Esterasa lipasa, Lipasa, Leucina arilamidasa, Valina arilamidasa, Cistina arilamidasa, Tripsina, Quimiotripsina, Fosfatasa ácida, Fosfoamida, α -Galactosidasa, β -Galactosidasa, β -Glucuronidasa, α -Glucosidasa, β -Glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -Manosidasa y α -Fucosidasa.

La inoculación de la galería se realizó depositando en cada microtubo 65 μ l de un cultivo líquido exento de micelio obtenido al incubar, en 5 ml de caldo glucosado de Sabouraud a 28°C durante 14 días, un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo de la cepa en estudio desarrollado en AGS durante 14 días a 28°C. La incubación de la galería se realizó a 28°C durante 6 h. Transcurrido este periodo de tiempo se procedió a realizar la lectura del ensayo siguiendo las normas de la casa comercial.

RESULTADOS

En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de detección de actividades enzimáticas por métodos cualitativos.

En la figura 1 se indican los porcentajes de cepas de las dos especies estudiadas que presentaron los enzimas ensayados mediante el método semicuantitativo API ZYM®.

Las concentraciones determinadas (expresadas en nanomoles) en cada una de las cepas en estudio (*M. canis*: 1-26; *M. gypseum*: 27-49) de los enzimas detectados siguiendo el método semicuantitativo API ZYM® se indican en la figura 2.

En la tabla 2 se resumen los perfiles enzimáticos de *M. canis* y *M. gypseum* obtenidos mediante el método semicuantitativo API ZYM®.

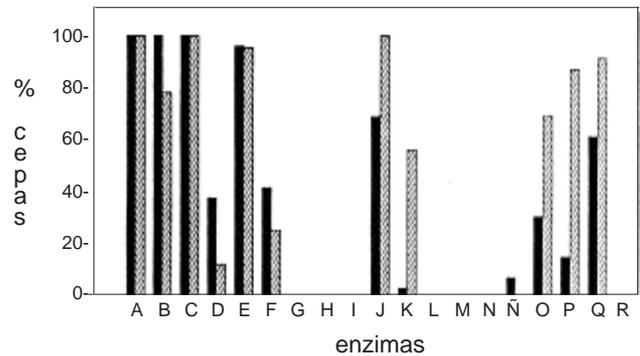


Figura 1. Porcentaje de cepas de *M. canis* (negro) y *M. gypseum* (rayado) que presentaron los enzimas ensayados mediante el método API ZYM®. A: Fosfatasa alcalina; B: Esterasa; C: Esterasa lipasa; D: Lipasa; E: Leucina arilamidasa; F: Valina arilamidasa; G: Cistina arilamidasa; H: Tripsina; I: Quimiotripsina; J: Fosfatasa ácida; K: Fosfoamida; L: α -Galactosidasa; M: β -Galactosidasa; N: β -Glucuronidasa; Ñ: α -Glucosidasa; O: β -Glucosidasa; P: N-acetil- β -glucosaminidasa; Q: α -Manosidasa; R: α -Fucosidasa.

DISCUSIÓN

En ninguna de las cepas ensayadas de ambas especies se detectaron las actividades amilolítica, DNásica, oxidásica y pectolítica (pectatoliásica y poligalacturonásica). Bodin [1] ya en la descripción de *A. gypseum* indica que esta especie no presenta actividad amilolítica. Tampoco ha sido citada en el género *Epidermophyton* [18]. Otros autores [21-23] también la citan para los géneros *Trichophyton* y *Arthroderma* (*Nannizzia*) aunque con marcada variabilidad según especies y/o cepas. La actividad DNásica fue detectada en cepas de *Epidermophyton*, no detectándose ni actividad oxidásica ni pectolítica (pectatoliásica y poligalacturonásica) en este género [18].

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de detección de actividades enzimáticas por métodos cualitativos. Actividades: AM: Amilolítica; CA: Catalásica; CE(7): Celulolítica (inóculo de 7 días de incubación); CE(14): Celulolítica (inóculo de 14 días de incubación); DN: Desoxirribonucleásica; FO: Fosfatásica; LI: Lipolítica; OX: Oxidásica; PE5: Pectolítica pH 5; PE7: Pectolítica pH 7; PR: Proteolítica; RN: Ribonucleásica; UC: Ureásica (método de Christensen); UH: Ureásica (método de Hankin). (1) Una cepa no presentó esta actividad.

ESPECIE	ACTIVIDADES ENZIMATICAS DETECTADAS																							
	AM 7	AM 14	CA 7	CA 14	CE (7) 7	CE (7) 14	CE (14) 7	CE (14) 14	DN 7	FO 7	LI 7	OX 7	OX 14	PE5 7	PE5 14	PE7 7	PE7 14	PR 7	RN 7	UC 7	UC 14	UH 7	UH 14	
<i>M. canis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+(1)	+	+	+	+	+	+
<i>M. gypseum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 2. Perfiles enzimáticos de *M. canis* y *M. gypseum* siguiendo el método API ZYM® (+: \geq 90% cepas positivas; d: 11-89% cepas positivas; -: \geq 90% cepas negativas). A: Fosfatasa alcalina; B: Esterasa; C: Esterasa lipasa; D: Lipasa; E: Leucina arilamidasa; F: Valina arilamidasa; G: Cistina arilamidasa; H: Tripsina; I: Quimiotripsina; J: Fosfatasa ácida; K: Fosfoamida; L: α -Galactosidasa; M: β -Galactosidasa; N: β -Glucuronidasa; Ñ: α -Glucosidasa; O: β -Glucosidasa; P: N-acetil- β -glucosaminidasa; Q: α -Manosidasa; R: α -Fucosidasa.

ESPECIE	ENZIMAS																		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P	Q	R
<i>M. canis</i>	+	+	+	d	+	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	d	d	-
<i>M. gypseum</i>	+	d	+	d	+	d	-	-	-	+	d	-	-	-	-	d	d	+	-

En el 100% de las cepas de *M. canis* y *M. gypseum* ensayadas se detectó actividad catalásica, celulolítica, fosfatásica, lipolítica, RNásica y ureásica. La actividad catalásica ha sido descrita en diversas especies de *Microsporium* incluyendo *M. canis* y *M. gypseum* [8], *Epidermophyton* [8,18], *Trichophyton* [8]. La actividad celulolítica fue en general más marcada en *M. gypseum* ya que los halos de clarificación del medio fueron mayores que los obtenidos en *M. canis*. Dicha actividad se puso también de manifiesto en cepas de *Epidermophyton* [18]. La actividad fosfatásica fue detectada por Jones y Noble [8] en diversas especies de dermatofitos. Otros autores indican también esta actividad en distintas especies, como *Arthroderma benhamiae* [11], *Arthroderma (Nannizzia) gypsea* [10], *Epidermophyton floccosum* y *Epidermophyton stockdaleae* [18]. La elaboración de enzimas lipolíticos, ha sido descrita en especies del género *Trichophyton* [21,22,24] y *Epidermophyton* [18]. En cuanto a la actividad RNásica, detectada en todas las cepas ensayadas, hemos de indicar que, en general, el desarrollo de las cepas y en especial las de *M. canis* en el medio de cultivo utilizado en este ensayo fue escaso. En otros estudios realizados anteriormente, esta actividad fue también observada en cepas de *E. floccosum* y *E. stockdaleae* [18].

La determinación de la hidrólisis de la urea se puede considerar como la prueba bioquímica más utilizada en la diferenciación de los dermatofitos, principalmente entre las especies *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* [12,15,21,22,25]. En nuestro estudio, todas las cepas ensayadas fueron positivas a los siete días de incubación mediante los dos métodos utilizados. Philpot [25] determina esta actividad a los siete días de incubación en todas las cepas de *Microsporium nanum* ensayadas y en algunas de *M. canis*, *Microsporium distortum*, *Microsporium persicolor* y *M. gypseum*, obteniendo resultados positivos para las restantes cepas ensayadas de este género a los 10, 14 o incluso 21 días de incubación (*Microsporium audouinii* y *M. persicolor*). Summerbell et al. [13] al ensayar *M. persicolor* detectaron también la hidrólisis de la urea a los siete días de incubación. También se indica la presencia del enzima ureasa en la mayoría de especies de *Trichophyton* ensayadas [25], en *E. floccosum* [18,25] y en *E. stockdaleae* [18].

Respecto al ensayo de detección de actividad proteolítica, hemos de indicar que todas las cepas fueron positivas a excepción de una cepa de *M. canis*. Minocha [4] indica una posible relación entre la gravedad de las lesiones que produce una determinada especie y el nivel de proteasas que contiene. Actividades proteolíticas han sido citadas en un número elevado de dermatofitos. Bodin ya indica en 1907 [1] que *A. gypseum* es capaz de degradar la gelatina. Actividades proteolíticas han sido descritas en *Trichophyton* [14,21-23,25-27], *Arthroderma (Nannizzia)* [23], *M. canis*, *M. gypseum* [25,27], *M. persicolor* [14,25], *Microsporium equinum* [25], *Arthroderma gloriae* [27], *E. stockdaleae* [18] y *E. floccosum* [4,18,25].

Tal como se puede deducir de los resultados obtenidos *M. canis* y *M. gypseum* presentan perfiles enzimáticos idénticos, no pudiéndose diferenciar ambas especies mediante las técnicas de detección de actividades enzimáticas empleadas.

De los resultados obtenidos mediante el método semicuantitativo API ZYM® observamos que en la totalidad de las cepas se detectó la presencia de fosfatasa alcalina y esterasa lipasa. La leucina arilamidasa fue detectada en más de un 90% de las cepas de ambas especies. La α -

glucosidasa no fue puesta de manifiesto en ninguna cepa de *M. gypseum* y en *M. canis* solamente en un 7,7%. En ninguna de las cepas ensayadas se observó cistina arilamidasa, tripsina, quimi tripsina, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa y α -fucosidasa. Los restantes enzimas ensayados se presentaron en porcentajes variables en ambas especies.

En la fosfatasa alcalina (enzima detectado en todas las cepas) las concentraciones determinadas en *M. gypseum* fueron superiores a las obtenidas en *M. canis*, ya que en la primera especie la concentración máxima fue ≥ 40 nmol y la mínima de 20 nmol, y en *M. canis* el valor máximo detectado fue de 30 nmol apreciado solamente en una cepa y la concentración más baja correspondió a 5 nmol. Rezusta [28] determinó asimismo dicha actividad en el 100% de las cepas ensayadas de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor* y *Arthroderma simii*. En cepas de *Epidermophyton* se observó también este enzima en la totalidad de éstas y las concentraciones determinadas fueron asimismo elevadas (≥ 40 nmol) [18]. En otro estudio realizado la fosfatasa alcalina fue también observada en cepas pertenecientes a los géneros *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Chrysosporium* [29], y *Trichophyton* [30]. Pereiro [31] la cita en *Arthroderma (Nannizzia) persicolor*.

El 100% de las cepas de *M. canis* elaboraron esterasa, mientras que en *M. gypseum* este porcentaje fue inferior, obteniéndose en ambas especies unas concentraciones máximas de 10 nmol. El enzima esterasa ha sido citado también en *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor*, *A. simii*, *M. canis* y *M. gypseum* [28], siendo en este estudio también superior el porcentaje de cepas productoras de dicho enzima en *M. canis* que en *M. gypseum*. En un estudio realizado en nuestro laboratorio con cepas de *Epidermophyton* las concentraciones apreciadas de este enzima resultaron ser también bajas (10 nmol) [18]. Dicho enzima ha sido también descrito en *A. persicolor* [31], y en cepas de *Epidermophyton*, *Microsporium* [29] y *Trichophyton* [29,30].

La concentración máxima determinada de esterasa lipasa (enzima detectado en todas las cepas) en las dos especies estudiadas fue también baja (10 nmol), si bien el porcentaje de cepas de *M. gypseum* con esta concentración fue superior al determinado en *M. canis*. Este enzima ha sido también citado en *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor*, *A. simii*, *M. canis* y *M. gypseum* en un elevado porcentaje de cepas [28]. También se ha descrito en cepas de *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Trichophyton* y *Chrysosporium* [29] y *A. persicolor* [31]. En otro estudio realizado se ha citado en cepas de *Epidermophyton* con una concentración máxima igual a la determinada en nuestro estudio (10 nmol) [18].

Los porcentajes de cepas en que se detectaron los enzimas lipasa (C14) y valina arilamidasa fueron superiores en *M. canis* que en *M. gypseum*, y la concentración apreciada en todas las cepas que presentaron estos enzimas fue la mínima que se puede determinar mediante la metodología empleada (5 nmol). Esta misma concentración se determinó en las dos únicas cepas de *M. canis* en que se observó la presencia de α -glucosidasa. El enzima lipasa (C14) no fue detectado en *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor*, *A. simii* [28], y tampoco en cepas de *Epidermophyton* [18]. Sin embargo, sí se ha descrito en cepas pertenecientes a los géneros *Microsporium*, *Epidermophyton* y *Chrysosporium* [29], *Trichophyton* [29,30] y también en *A. persicolor* [31].

La valina arilamidasa ha sido citada en *A. persicolor* [31], *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, pero no en *M. persicolor*, *A. simii* [28] y

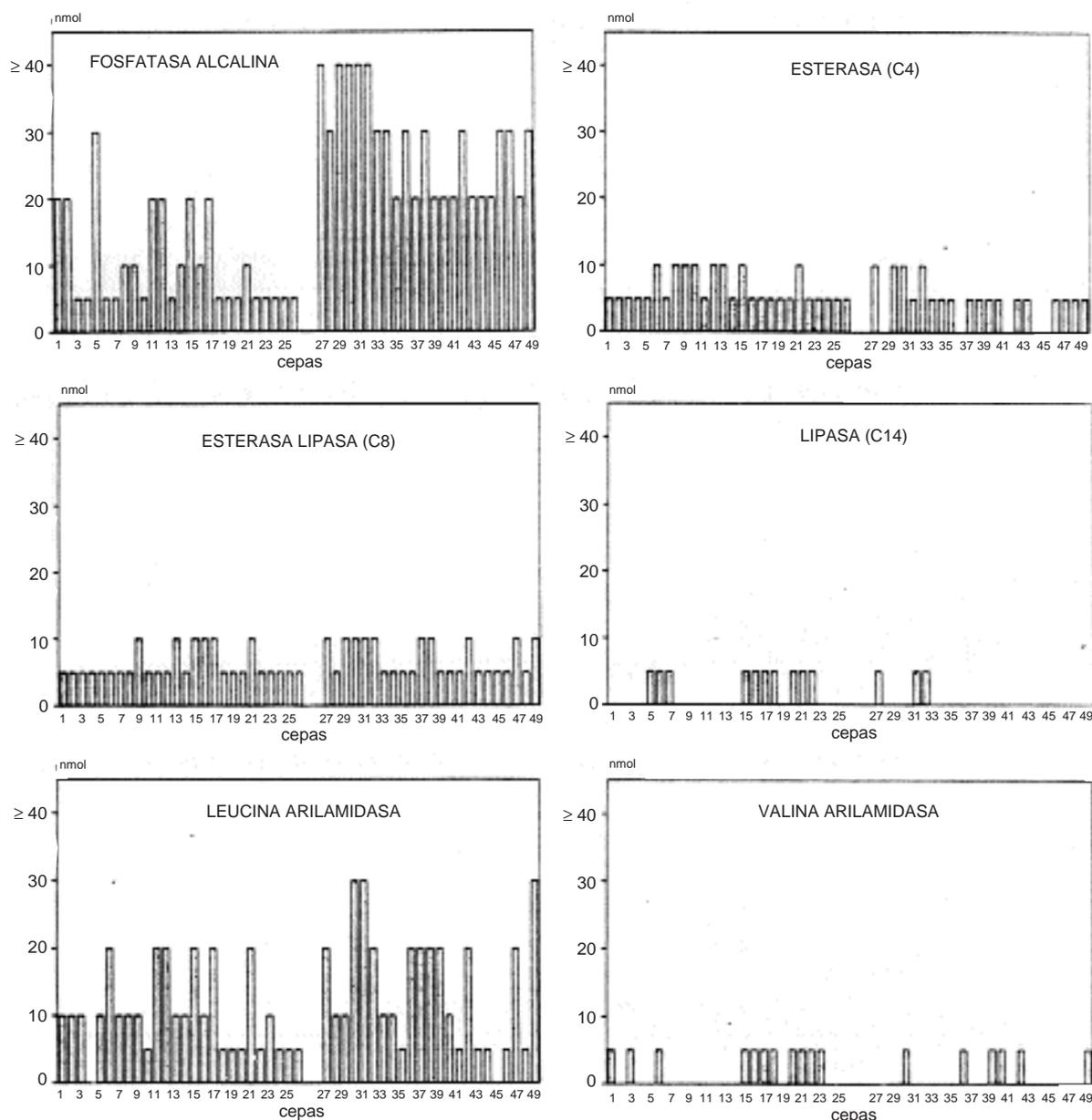


Figura 2 . Concentraciones (nmol) de los enzimas detectados en cada una de las cepas ensayadas (*M. canis*: 1-26; *M. gypseum*: 27-49) mediante el método semicuantitativo API ZYM®.

Epidermophyton [18]. Sin embargo en otro estudio [29] su presencia fue puesta de manifiesto en cepas de *Epidermophyton*, *Chrysosporium*, *Microsporium* y *Trichophyton*.

El enzima α -glucosidasa sólo fue detectado en dos cepas de *M. canis*. También ha sido citado en *T. mentagrophytes* [28,29], y en algunas cepas de los géneros *Microsporium*, *Epidermophyton* y *Chrysosporium* también a bajas concentraciones [29].

La leucina arilamidasa, se puso de manifiesto en un elevado porcentaje de cepas de ambas especies, siendo la concentración máxima determinada de este enzima en *M. gypseum* superior a la apreciada en *M. canis*. Dicho enzima también fue determinado, en general, en porcentajes elevados de cepas de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor*, *A. simii* [28], *Epidermophyton* [18], en cepas de los géneros

Chrysosporium y *Microsporium*, y en menor proporción en *Trichophyton* [29]. Pereiro [31] también la cita en *A. persicolor*.

En *M. gypseum*, la fosfatasa ácida, al igual que la fosfatasa alcalina, se detectó en la totalidad de las cepas, mientras que en *M. canis* el primer enzima sólo se ha observado en un 69,2% de las cepas. Las concentraciones determinadas en las cepas de ambas especies fueron variables, aunque se observan, en general, mayores concentraciones en *M. gypseum* que en *M. canis*. Podemos decir también que las concentraciones determinadas en la fosfatasa ácida fueron inferiores a las determinadas en la fosfatasa alcalina. Esta diferencia en las concentraciones apreciadas en los dos enzimas considerados también se observó en cepas de *Epidermophyton* [18]. La fosfatasa ácida ha sido citada también en cepas de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor* y

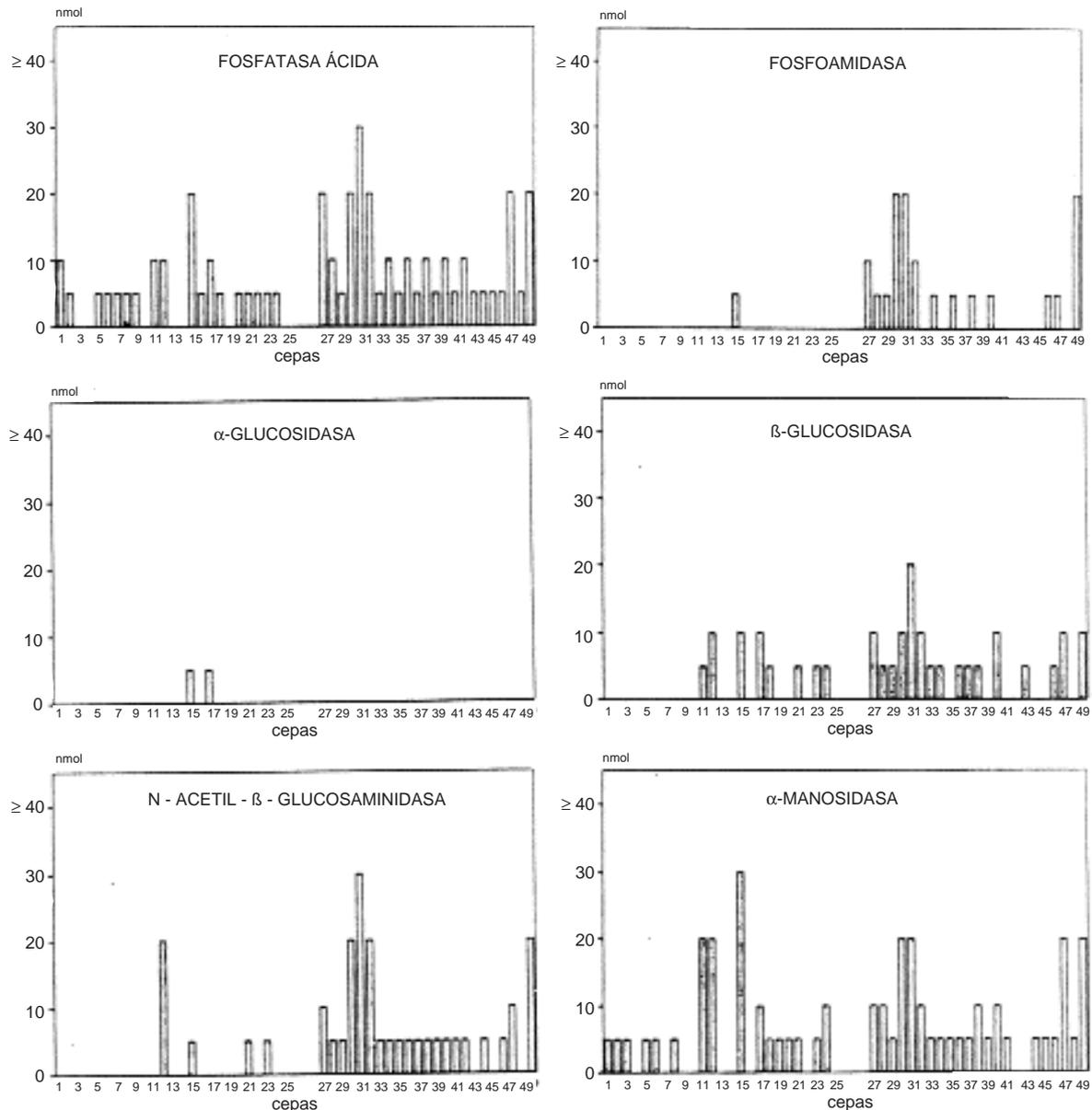


Figura 2 (Continuación). Concentraciones (nmol) de los enzimas detectados en cada una de las cepas ensayadas (*M. canis*: 1-26; *M. gypseum*: 27-49) mediante el método semicuantitativo API ZYM®.

A. simii [28], en *A. persicolor* [31], en cepas de *Epidermophyton*, *Chrysosporium*, y *Microsporium* [29], y *Trichophyton* [30].

En los enzimas fosfoamidasa, β-glucosidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa y α-manosidasa, los porcentajes de cepas en que se detectó su presencia fueron superiores en *M. gypseum* que en *M. canis*, presentándose en general unas concentraciones de estos enzimas algo superiores en el caso de *M. gypseum*. Estos enzimas han sido también indicados en *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. persicolor*, *A. simii* [28], *A. (N.) persicolor* [31] y en cepas de *Epidermophyton* [18,29], *Chrysosporium*, *Microsporium* [29] y *Trichophyton* [29,30].

Si hacemos referencia a los enzimas que no se han detectado en ninguna de las cepas ensayadas en nuestro estudio (cistina arilamidasa, tripsina, quimi tripsina, α-

galactosidasa, β-galactosidasa, β-glucuronidasa y α-fucosidasa) otros autores sí citan algunas de ellas en distintos géneros y especies de dermatofitos y hongos queratinofílicos. Rezusta [28] sólo determinó quimi tripsina en *M. canis* en un bajo porcentaje de cepas. Pereiro [31] cita la presencia de cistina arilamidasa, tripsina y β-galactosidasa en *A. persicolor*. Calvo et al. [29] detectaron cistina arilamidasa y tripsina en cepas de *Chrysosporium*, *Epidermophyton* y *Microsporium*, α-galactosidasa en *Chrysosporium*, *Microsporium* y *Trichophyton*, α-fucosidasa en *Epidermophyton*, quimi tripsina en cepas de todos los géneros ensayados en su estudio, mientras que sólo detectaron β-glucuronidasa en *Chrysosporium*.

Con estos resultados, se observa que los perfiles enzimáticos obtenidos en las dos especies estudiadas son similares a los determinados por Rezusta [28] en *M. canis* y *M. gypseum*, si bien este autor no indica la presencia de

lipasa y α -glucosidasa en estas especies, pero sí quimioproteína en cepas de *M. canis* aunque con un porcentaje de positividad muy bajo.

De los resultados obtenidos en este estudio se puede deducir que no se observaron diferencias muy marcadas entre los perfiles enzimáticos que presentan las especies *M. canis* y *M. gypseum*. No obstante se puede apreciar, aunque con cierta variabilidad, que tanto el porcentaje de cepas productoras de enzimas como las concentraciones producidas de las mismas fueron algo más elevadas en la especie *M. gypseum*. Si hacemos referencia al origen de las cepas, no se observaron tampoco diferen-

cias notables entre los distintos grupos de procedencia establecidos (*M. canis*: humana y animal; *M. gypseum*: humana, animal y suelos). Si bien existen algunas cepas que presentan actividades enzimáticas superiores al resto, éstas no pertenecen a un grupo en concreto, si no que se distribuyen entre los distintos grupos establecidos.

Nuestro agradecimiento a A. del Palacio Herranz, M. Pereiro Miguens, J.M. Torres-Rodríguez y M. Ventín Hernández por habernos proporcionado desinteresadamente algunas de las cepas objeto de estudio.

Bibliografía

- Bodin E. Sur un nouveau champignon du favus (*Achorion gypseum*). Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie 1907; 8: 585-602.
- Bentley ML. Enzymes of pathogenic fungi. J Gen Microbiol. 1953; 8: 365-377.
- Hopsu-Havu VK, Tunnela E. Production of elastase, urease and sulphatase by *Epidermophyton floccosum* (Harz) Langeron et Milochewitch (1930). Mykosen 1977; 20: 91-96.
- Minocha Y. Proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. Sabouraudia 1972; 10: 79-85.
- Skorepova M, Hauck H. Extracellular proteinases of *Trichophyton rubrum* and the clinical picture of tinea. Mykosen 1987; 30: 25-27.
- Rippon JW, Varadi DP. The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. J Invest Dermatol 1968; 50: 54-58.
- Werb Z, Banda MJ, McKerrrow JH, Sandhaus RA. Elastase and elastin degradation. J Invest Dermatol 1982; 79: 154-159.
- Jones MG, Noble WC. An electrophoretic study of enzymes as a tool in the taxonomy of the dermatophytes. J Gen Microbiol 1982; : 1101-1107.
- Kane J, Smitka C. A practical approach to the isolation and identification of members of the *Trichophyton rubrum* group. pp. 121-134. En: Proceedings of the Fifth International Conference on the mycoses. Caracas (Venezuela) (P.A.H.O. n° 396). Washington D.C, 1980.
- Sekhon AS. Effects of age on fresh weight, proteins, peroxidases, and other enzymes of the +, -, and crossed gymnothecial cultures of *Nannizzia gypsea*. Mycopathologia 1977; 60: 145-149.
- Sekhon AS, Carmichael JW. Electrophoretic analyses of proteins, peroxidases, and phosphatases of single and mated cultures of *Arthroderma benhamiae*. Mycopathologia 1976; 58: 97-100.
- Sinski JT, Avermaete DV, Kelley LM. Analysis of tests used to differentiate *Trichophyton rubrum* from *T. mentagrophytes*. J Clin Microbiol 1981; 13: 62-65.
- Summerbell RC, Rosenthal SA, Kane J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2279-2282.
- Weitzman I, Rosenthal S. Studies in the differentiation between *Microsporum ferrugineum* Ota and *Trichophyton soudanense* Joyeux. Mycopathologia 1984; 84: 95-101.
- Philpot CM. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a simple urease test. Sabouraudia 1967; 5: 189-193.
- Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 1975; 67: 597-607.
- Cowan ST, Steel KJ. Identification of medical bacteria. (2ª ed). Cambridge University Press 1974.
- Cabañes FJ, Abarca L, Bragulat MR, Bruguera MT, Calvo MA. Determinación de actividades enzimáticas en cepas del género *Epidermophyton*. Rev Iber Micol 1988; 5: 63-73.
- Hankin L, Zurcker M, Sands DC. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. Appl Microbiol 1971; 22: 205-209.
- Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J Bacteriol 1946; 52: 461-466.
- Kunert J, Lenhart K. Studies on the variability of dermatophytes. III. Physiological characteristic of *Trichophyton rubrum* strains. Act Univ Palack Olomuc 1979; 89: 23-34.
- Kunert J, Lenhart K. Studies on the variability of dermatophytes. VI. Physiological characteristic of *Trichophyton mentagrophytes* strains. Act Univ Palack Olomuc Fac Med 1981; 99: 73-83.
- Singh KV, Agrawal SC. Use of solid media for detection of enzymes by keratinophilic fungi and dermatophytes. Acta Botanica Indica 1982; 10: 288-290.
- Das SK, Banerjee AB. Lipolytic enzymes of *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia, 1977; 15: 313-323.
- Philpot CM. The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. Sabouraudia 1977; 15: 141-150.
- Apodaca G, McKerrrow JH. Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. J Med Vet Mycol. 1990; 28: 159-171.
- Kunert J, Kasafirek E. Preliminary characterization of extracellular proteolytic enzymes of dermatophytes by chromogenic substrates. J Med Vet Mycol 1988; 26: 187-194.
- Rezusta A. Estudio de las dermatofitos en Aragón, aportación al comportamiento bioquímico de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*. Tesis doctoral 1987. Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.
- Calvo MA, Bruguera MT, Cabañes FJ, Calvo RM, Trape J, Abarca L. Extracellular enzymatic activities of dermatophytes. Mycopathologia 1985; 92: 19-22.
- Calvo MA, Abarca L, Trape J. Estudio comparativo entre *Trichophyton mentagrophytes* y *T. verrucosum*. Sabouraudia 1981; 19: 9-11.
- Pereiro M, Pereiro MM. *Nannizzia persicolor*. Etude de 2 souches d'origine humaine isolées en Galice. Bull Soc Mycol Méd. 1981; 10: 245-251.