

## ESTUDIO MICOLOGICO DE DOS HONGOS SIMILARES AL HISTOPLASMA CAPSULATUM

Por P. NEGRONI y C. BRIZ DE NEGRONI

El *Histoplasma capsulatum* fué descubierto por Darling en 1906, pero corresponde a Da Rocha Lima el mérito de reconocer en 1913, su naturaleza vegetal; hecho demostrado, en 1934, por de Monbreun al obtener los primeros cultivos. Desde entonces, se registraron numerosos casos clínicos en diversos países del mundo, pero con mayor frecuencia en los EE. UU. y en la Argentina, en donde fué señalada por Negróni en 1937, por primera vez.

En 1945, Palmer, Parsons y Zarafonetis y, luego, Christie y Paterson, Ferebee y Furcolow y muchos otros investigadores norteamericanos, señalaron una nueva etapa en el conocimiento de esta micosis al descubrir que, además de sus formas evolutivas y esporádicas, la histoplasmosis existe endémicamente en determinadas zonas. La primoinfección pasa inadvertida (sin manifestaciones o subclínica), revelándose por la respuesta positiva a la histoplasmina asociada, frecuentemente, a focos de calcificación pulmonar.

De Monbreun, Emmons y Pará entre otros investigadores, comprobaron que los animales domésticos y salvajes pueden contraer espontáneamente la histoplasmosis (perro, gato, caballo, zorrilla, ratas y ratones) lo cual indicaba una fuente de infección común para el hombre y los animales. Estas observaciones, unidas a la posibilidad de la infección por la vía inhalatoria, movió a los investigadores norteamericanos a buscar la presencia del *Histoplasma capsulatum* en el suelo, objetivo cumplido exitosamente por Emmons en 1949 y luego, por Ajello y Zeidberg (1951), Grayston y colaboradores (1951), Furcolow y colaboradores (1952).

En el año 1951, con motivo de nuestra encuesta epidemiológica sobre la enfermedad de Posadas en las provincias de Tucumán y Santiago del Estero, recogimos 70 muestras de tierra cuya flora micológica fué estudiada en el laboratorio de micología de este Instituto. De la muestra n° 62 obtuvimos el desarrollo de un hongo filamentoso

cuyos esporos asexuados eran idénticos a los del *H. capsulatum*, pero cuyo estudio micológico completo permitió clasificarlo como *Thielavia sepedonium* de la clase *Ascomycetes*.

Recientemente, sembrando el material obtenido por biopsia de un caso de histoplasmosis hematógena, aislamos, además del *H. capsulatum*, otro hongo filamentoso casi idéntico, del género *Sepedonium* Link.

Exponemos a continuación el estudio micológico de estos dos hongos y un cuadro comparativo de los caracteres del *H. capsulatum* y hongos con los cuales presenta ciertas semejanzas, que pueden inducir a error de clasificación.

### ESTUDIO MICOLÓGICO

*Cepa N° 2.120*, aislada de la muestra de tierra N° 62 recogida en el trayecto de La Banda a Santiago del Estero.

*Caracteres macromorfológicos.* — En el medio de Czapek-Dox la colonia gigante al cabo de 8 días de incubación a 30°, cubre toda la superficie de la caja de Petri de 10 cm. de diámetro, es vellosa, de color amarillo canario y plana. Reverso amarillento. En el mismo medio inclinado en tubos de ensayos, al cabo de 20 días, el desarrollo es velutino con zonas lanosas lenticulares blancas siendo el resto, amarillento. Los bordes presentan numerosos granitos pardos, comparables a granos de pimienta. El reverso es anaranjado, pigmento que se difunde en el medio.

En el agar miel de Sabouraud (en tubo inclinado): el desarrollo presenta caracteres similares al anterior.

*Zanahoria:* al cabo de 16 días el desarrollo cubre toda la superficie del medio, es blanco amarillento con zonas grises, ligeramente mamelonado y con pequeños granos parduscos. En la superficie del líquido presenta una película.

*Papa simple:* al cabo de 16 días a 25° el desarrollo es veloso, blanco y cubre toda la superficie del medio. En la superficie del líquido forma una película con los mismos caracteres.

*Papa glicerizada:* desarrollo similar al anterior.

*Agar papa glucosado:* al cabo de 16 días el desarrollo es granuloso, gris y cubierto de gotitas amarillentas. Reverso: amarillo pardo.

*Medios de Loeffler y de Loewenstein:* como en la papa.

*Mosto de cerveza líquido:* al cabo de 16 días forma un velo grueso, plegado, veloso y de color amarillo canario.

*Caracteres micromorfológicos.* — El micelio es filamentoso, ramificado, tabicado, hialino y de 1 a 2.5  $\mu$  de diámetro.

La fructificación asexual consiste en la formación de macroaleurias verrugosas o cubiertas de tubérculos, globosas y, más raramente, subglobosas o elípticas, ligeramente pigmentadas (amarillentas), de 8.7 a 10  $\mu$  de diámetro que nacen sobre cortos pedículos.

La fructificación sexual consiste en la formación de peritecios en el micelio aéreo, globosos, oscuros casi negros, de 52 a 82  $\mu$  de diámetro y su membrana peridial consiste, aparentemente, en una sola capa de células. Los ascos, dispuestos irregularmente en el interior del peritecio, son elípticos o piriformes, hialinos de membrana fina, de 26-27 x 15-16  $\mu$  con 8 ascosporos que quedan libres dentro del peritecio por desintegración de la membrana de los ascos.

Los ascosporos son elípticos, presentan frecuentemente una depresión semiesférica hacia un polo, son pardo oscuros o negros, de paredes lisas y miden 14.87 x 7.28  $\mu$ .

*Caracteres fisiológicos.* — La temperatura óptima para el desarrollo vegetativo es de 37°.

Auxanograma de las fuentes de nitrógeno: urea++++, asparagina+++ , peptona++ , sulfato de amonio++ , histidina+ , nitrato de potasio: negativo.

Auxanograma de las fuentes de carbono: glucosa++ , maltosa++ , sacarosa++ , lactosa+ , galactosa: negativo y rafinosa: negativo. Utiliza el alcohol etílico como única fuente de carbono.

Licua la gelatina, coagula y peptoniza la leche. No forma hidrógeno sulfurado.

*Clasificación Thielavia sepedonium* Emmons, 1952.

Cepa n° 4450, aislada de un caso de histoplasmosis hematogena observado en Buenos Aires.

*Caracteres macromorfológicos.* — En el medio de Czapek-Dox el micelio aéreo es muy escaso y aracnoide; el micelio sumergido es, en cambio, abundante, zonado y pardusco. En el agar miel de Sabouraud en tubo de ensayo, el desarrollo cubre al cabo de 12 días de incubación a 37° toda la superficie del pico de clarinete. Es vellosa, de un color gris oscuro como piel de rata, en el tercio superior y más claro en los dos tercios inferiores. Presenta un esbozo de zonación y el borde es plano y gris pálido. Reverso: pardo oscuro. A 28° el desarrollo es algo menos exuberante, presenta una banda central ligeramente rosada, gotitas hialinas en la superficie y un borde de micelio aéreo blanco, seguido de otro de micelio rampante de unos 4 mm. de diámetro.

En el agar glucosado a 37° de incubación al cabo de 12 días, el desarrollo cubre toda la superficie del medio de cultivo, es vellosa, blanco, semizonado, con algunas bandas ligeramente grisáceas y al-

gunas gotitas parduscas en el centro. El borde, de 1 a 2 mm. de diámetro está formado por micelio rampante fino. Existe un surco profundo radialmente dispuesto. Reverso: oscuro en el centro y rojizo en los bordes.

*Agar mosto de cerveza* (12 días a 37°): desarrollo de unos 5 cm. de diámetro longitudinal, lampiño, húmedo, brillante y estriado en unas zonas y cubierto de micelio aéreo blanco, en otras. A 28° el desarrollo es igual al del agar glucosado.

*Zanahoria*: Al cabo de 12 días a 37° el desarrollo presenta el aspecto de una membrana gruesa, lampiña, húmeda, brillante y plana que cubre casi toda la superficie del medio. En la zona central existen tres botones de micelio aéreo de pocos milímetros de diámetro. A 28° no hubo desarrollo.

*Papa simple* (12 días a 37°): forma una membrana hialina, gruesa, lampiña, húmeda y brillante, con algunos pliegues gruesos. En la parte media existe una zona de 1 cm. de diámetro algo elevada y cubierta de mechass. Al cabo de 45 días el desarrollo está formado por un vello corto y gris, comparable a la piel de rata, con algunos mechones blanquecinos. El líquido del fondo tiene un tinte rojo vinoso y, en la superficie del mismo, existe una membrana miceliana gruesa, con numerosas gotitas de color rojo vinoso. A 28° el desarrollo es muy escaso.

*Papa glicerizada* (12 días a 37°): tiene los mismos caracteres que en el medio anterior, pero en varias zonas existen mechass (funículos). No produce pigmento.

*Agar sangre* (12 días a 37°): desarrollo formado por un vello corto y gris que cubre toda la superficie del medio. Las tentativas para obtener un desarrollo levaduriforme fueron infructuosas.

*Medio de Loeffler* (12 días a 37°): desarrollo grisáceo con escaso micelio aéreo. No hay digestión del medio.

*Medio de Dorset* (12 días a 37°): desarrollo abundante veloso gris oscuro en el centro y más claro en la periferia. Borde de micelio aéreo casi blanco. El reverso presenta un borde oscuro casi negro. A 28° no se desarrolla.

*Caldo glucosado* (12 días a 37°): forma un copo miceliano que ocupa la mitad inferior del tubo. Al cabo de un mes y medio ha llegado hasta la superficie, donde forma una membrana húmeda. A 28° no se desarrolla.

*Mosto de cerveza* (12 días a 37°): membrana gruesa, vellosa, pardusca, de bordes blancos por el anverso y casi negros por el reverso. No se desarrolla a 28°.

*Caracteres fisiológicos.* — Auxanograma de las fuentes de carbono: glucosa++, galactosa++, lactosa+, maltosa++, sacarosa++, rafinosa++. No se desarrolla en el alcohol etílico como única fuente de carbono.

Auxanograma de las fuentes de nitrógeno: peptona++++, histidina+++ , asparagina++++, urea++, sulfato de amonio+++ , nitrato de potasio+. No se desarrolla en el mosto de cerveza gelatinado a 20°.

Coagula la leche con retracción del coágulo pero sin peptonizarlo. Temperatura óptima para el desarrollo vegetativo: 37°.

*Caracteres micromorfológicos.* — Micelio vegetativo hialino, ramificado y tabicado de 2-2,50  $\mu$ . Macroaleurias verrugosas o cubiertas de tubérculos, pigmentadas en pardo de 2,75  $\mu$  a 5,1  $\mu$  de diámetro, siendo la mayoría de 3,5  $\mu$  y globulosas. Los esporos son más verrugosos y pigmentados en los medios minerales con peptona y asparagina. Las macroaleurias nacen aisladas o en grupos de 2 ó 3 sobre cortos esporoforos de 3 a 5  $\times$  2  $\mu$ , algo más estrechos en su parte distal sobre la que se implanta el espora mediante una faceta plana.

Clasificación: *Sepedonium* sp.

*Inoculaciones experimentales.* — Tres lotes de dos cobayos de 400 gr. aproximadamente fueron inoculados con material de cultivos de las siguientes cepas: n° 2120: *Thielavia sepedonium*, n° 4450: *Sepedonium* sp. y 922 *Histoplasma capsulatum* en tres días consecutivos de cada semana, durante tres semanas. Un cobayo de cada lote fué inoculado por la vía peritoneal y el otro intramuscularmente. Quince días después de la última inyección se probó la reactividad cutánea a la histoplasmina con los siguientes resultados:

Cobayo 695 inoculado por la vía peritoneal con material de cultivo de la cepa 2120: negativo; cobayo 470 inoculado por la vía intramuscular: positivo. Cobayo 815 inoculado por la vía peritoneal con material de la cepa 4450: positivo; cobayo 712 inoculado intramuscularmente positivo+.

Cobayo 122 inoculado por la vía peritoneal con material de cultivo de la cepa 922+++; cobayo 182 inoculado intramuscularmente con el mismo material+.

Esta reacción repetida a la semana siguiente, dió el mismo resultado. Los cobayos no presentaban signos de enfermedad, fueron sacrificados y, en la autopsia, no presentaban alteraciones macroscópicas.

*Consideraciones.* — Existen en el suelo, además del verdadero *Histoplasma capsulatum*, hongo patógeno para el hombre y los animales, otros hongos perfectos (Ascomycetes) e imperfectos cuyos ca-

Género y especie	Micelio vegetativo	Microaleurias
<i>Histoplasma capsulatum</i> Darling.	Fase parasitaria: células ovals, brotantes de 1 a 5 $\mu$ . Fase saprofítica micelio hialino, tabicado de 2 a 5 $\mu$ .	piriformes, lisas de 2.5 a 3 $\mu$ , sesiles o sobre cortos pedículos, en el micelio aéreo o sumergido.
<i>Sepedonium chrysospermum</i>	hialino, de 2 a 4 $\mu$ .	
<i>Sepedonium xylogenum</i> Sacc.		
<i>Sepedonium</i> sp. cepa 4450	hialino, ramificado y tabicado de 2 a 2.5 $\mu$ .	
<i>Stephanoma tetracoccum</i> van Zinderen-Bakker		
<i>Chlamydomyces palmarum</i> (Cke) Mason		
<i>Mycogone</i> Link		
<i>Thielavia sepedonium</i> Emmons		

Macroaleurias	Conidias	Fruct. sexuada	Temp. óptima
esféricas o piriformes con tubérculos o digitaciones, sesiles o pediculadas; 10 a 25 $\mu$ de D. en el m. séreo; íd. lisas, de 5 a 20 $\mu$ pediculadas, en el m. sumergido.			del desarrollo vegetativo y de la esporulación: 25°
de 14 a 16 $\mu$ con tubérculos o verrugas, amarillas o doradas, sobre pedículos simples o ramificados con dilataciones bulbosas, en el m. aéreo.	hialinas, lisas o voides, de 8-11 x 5-6 $\mu$ , en grupos o cabezuelas.		desarrollo vegetativo: 20°; esporulación: 25°
íd., las verrugosidades se forman por plegamiento de la membrana.			desarrollo vegetativo y esporulación: 25°
globulosas, con tubérculos o verrugas, pardas de 2.75 a 5.1 $\mu$ ; aisladas o en grupos sobre esporos del m. aéreo.			desarrollo vegetativo y esporulación: 37°
sobre ramas del m. aéreo con dilat. globosas que se tornan verruosas.	sobre fialides alargadas y en verticilos		desarrollo vegetativo y esporulación: 20°
bicelulares; cel. sup. esférica u oval truncada, verrugosa y oscura; cel. inf. en cono truncado invertido sobre pedículos ramificados.	fialides de 6-9 x 5 $\mu$ ; conidias oblongas, lisas, hialinas de 4 x 2 en cadenas o cabezuelas		
bicelulares; cel. sup. mayor, verrugosa, pigmentada; únicas en el extremo de ped. cortos.	fialides en verticilos, conidias alargadas.		
verrugosas, con tubérculos o papilas, en cadenas cortas o aisladas de 7 a 10 $\mu$ sobre pedículos ramificados.		peritecios oliváceos de 70 a 150 $\mu$ ascos ovoides de 17 a 30 $\mu$ con 8 ascosporos elípticos de 14-19 x 7-10 $\mu$ oliváceos.	desarrollo vegetativo y esporulación: 37°

racteres botánicos similares a los del mencionado, pueden inducir a un error de clasificación. Estos hongos, considerados hasta el presente como saprofitos para el hombre, pertenecen a los siguientes géneros *Thielavia* (Ascomycete), *Sepedonium*, *Stephanoma*, *Chlamydomyces* y *Micogone*. En nuestra segunda observación, el *Sepedonium* sp. se desarrolló simultáneamente con el *Histoplasma capsulatum*, en las siembras efectuadas con el material extraído de las lesiones cutáneas de un paciente con forma evolutiva de histoplasmosis. Tanto esta cepa de *Sepedonium* como la de *Thielavia* aislada de una muestra de tierra de Santiago del Estero, tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37°, lo cual les permitiría vivir en el organismo humano. Finalmente, las inoculaciones experimentales al cobayo, han permitido revelar cierto grado de sensibilización cruzada con la histoplasmina.

*Resumen.* — Presentamos el estudio micológico de dos hongos semejantes al *Histoplasma capsulatum*. La cepa de *Thielavia sepedonium* fué aislada de una muestra de tierra recogida en Santiago del Estero y *Sepedonium* sp. creció simultáneamente con el *Histoplasma capsulatum* en las siembras efectuadas con el material recogido de las lesiones pápuloulcerosas de un paciente con histoplasmosis.

### SUMMARY

We have studied the mycological characteristics of two *Histoplasma*-like fungi. *Thielavia sepedonium* was isolated from a sample of soil from Santiago del Estero and *Sepedonium* sp. developed simultaneously with *Histoplasma capsulatum* by culturing the material obtained from the cutaneous lesions of a case of histoplasmosis.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) DARLING, S. T. — J. A. M. A., 64, 1238, 1906.
- 2) DA ROCHA LIMA, H. — Zentralb. f. Bakt., Orig., Abt. I, 66/67, 233, 1912-13.
- 3) NEGRONI, P. — Rev. Inst. Bact. (Buenos Aires), 9, 239, 1940.
- 4) BALIÑA, P. L., NEGRONI, P., BOSQ, P. Y HERRERA, J. — Rev. Arg. Dermatol., 1941, 25, 491.
- 5) BALIÑA, P. L., HERRERA, J., BOSQ, P. Y NEGRONI, P. — Rev. Arg. Dermatol., 27.
- 6) NEGRONI, P., MOM, A. Y TORRES ZAVALTA. — Rev. Arg. Dermatosisif., 35, 61, 1951.
- 8) NEGRONI, P. — Fundación L. Sierras, Jorn. Clin. Verano (Viña del Mar, Chile, p. 22, 1950.
- 8) PALMER, C. — Public H. Report, 60, 513, 1945.
- 9) PARSONS, R. J. AND ZARAFONETIS, C. J. D. — Arch. Internal Med., 75, 1, 1945.
- 10) CHRISTIE, A. AND PETERSON, J. C. — Amer. J. Public Health, 35, 1131, 1945.
- 11) FEREBEE, S. H. AND FURCOLOW, M. L. — P. H. Reports, 62, 834, 1947.
- 12) FURCOLOW, M. L. — P. H. Reports, 65, 965, 1950.
- 13) EMMONS, C. W. — P. H. Reports, 64, 892, 1949.
- 14) AJELLO, L. AND ZEIDBERG, L. D. — Science, 113, 662, 1951.
- 15) GRAYSTON, J. T. ET AL. — Science, 114, 323, 1951.
- 16) FURCOLOW, M. L. ET AL. — Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 80, 246, 1952.

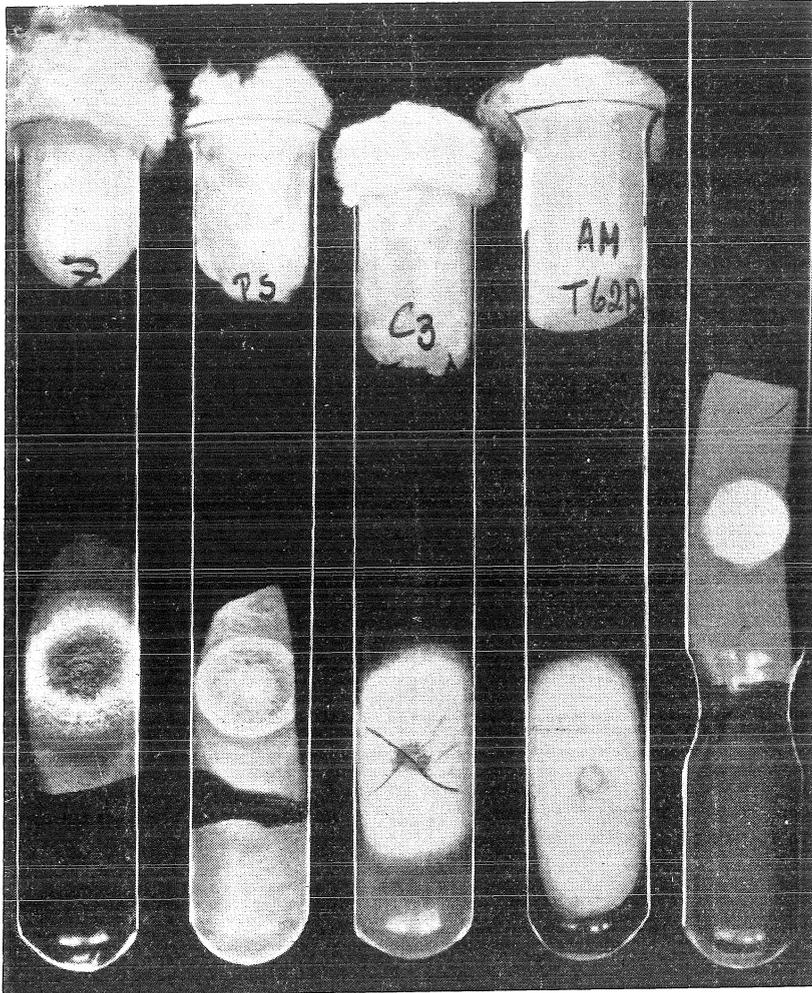


Fig. 1. — Aspecto macromorfológico de *Thielavia sepedonium* en los siguientes medios de cultivo (de izquierda a derecha): zanahoria, papa simple, Czapek, agarmiel y papa glicerizada.

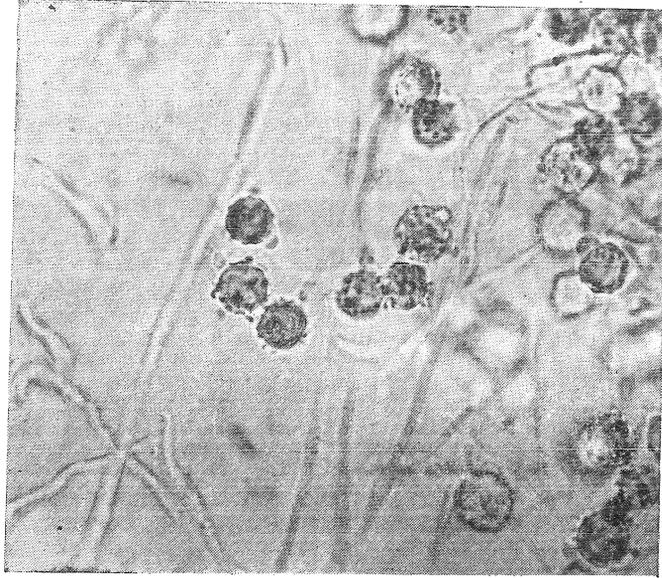


Fig. 2. — Macroconidias verrugosas de *Thielavia sepedonium* (cepa nº 62).

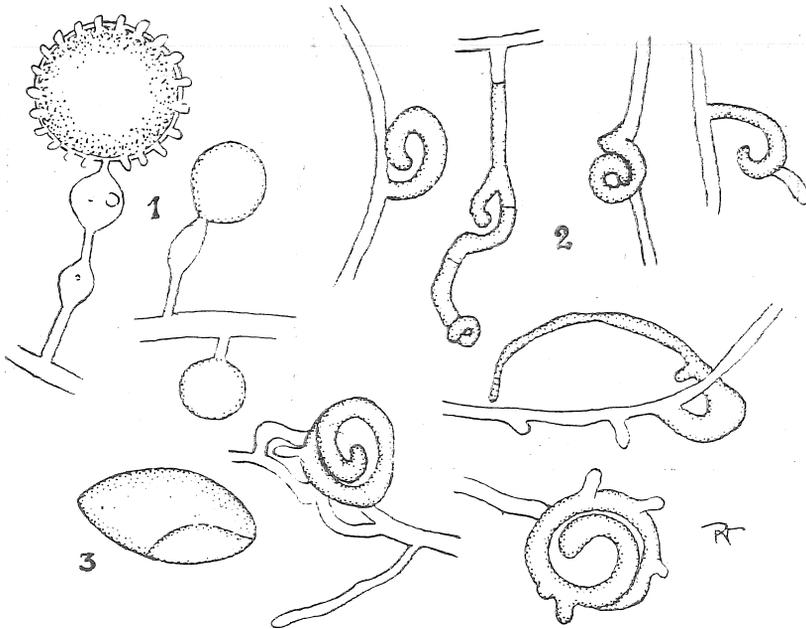


Fig. 3. — Aspecto micromorfológico de *Th. sepedonium* (cepa nº 62) tomado con la cámara clara. 1: formación de las macroconidias; 2: formación de los elementos sexuales, el ascogonio espiralado y anteridio recto; 3: ascosporo elíptico.

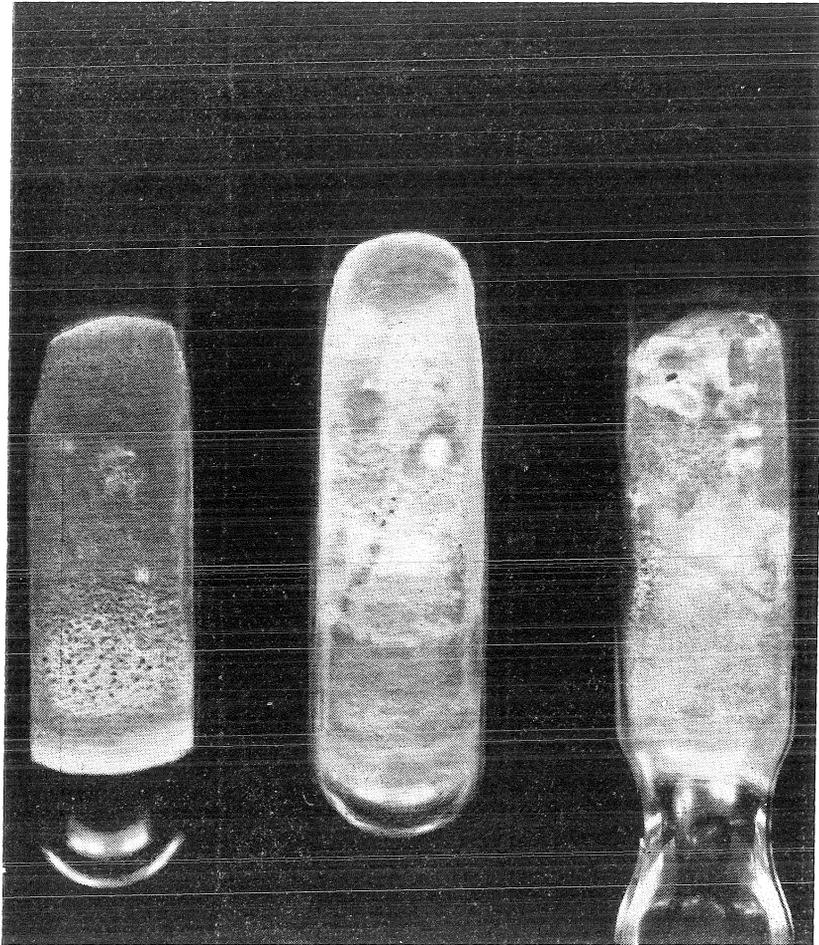


Fig. 4. — Aspecto del desarrollo de *Spedonium* sp. (cepa nº 4450) en los siguientes medios de cultivo (de izquierda a derecha): Czapek, agar-miel y papa.

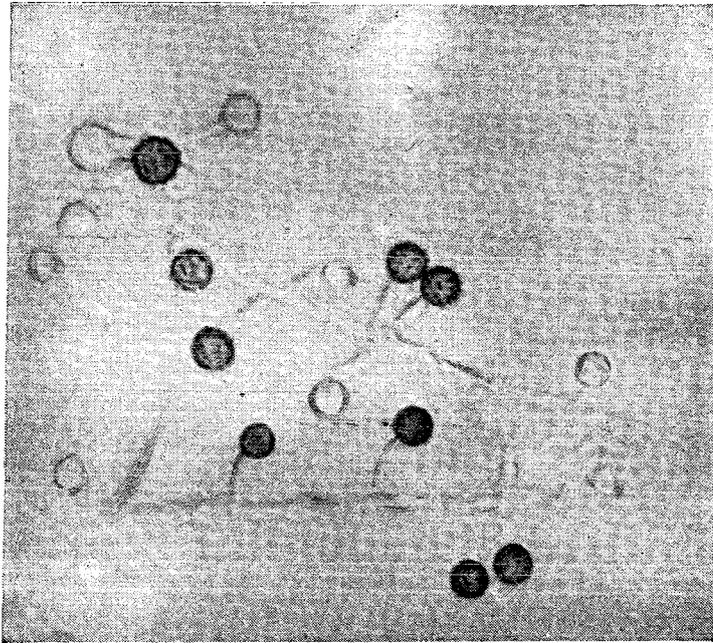


Fig. 5. — Macroconidias y esporóforos de *Sepedonium* sp. (cepa 4450) en un cultivo por adhesión.