

## Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist

### II. Estudio micológico de las cepas autóctonas y revisión del granuloma coccidioidal en la Argentina.

Por P. NEGRONI

El granuloma coccidioidal fué descubierto por Alejandro Posadas, de Buenos Aires <sup>(1)</sup>, quien lo estudió en colaboración con su maestro Roberto Wernicke, de ahí que esta afección se la designe, también, como enfermedad de Posadas - Wernicke.

Su agente fué tan minuciosamente estudiado por Posadas que, salvo la obtención de los cultivos, poco es lo que se ha agregado en los 50 años siguientes. Llama la atención, sin embargo, el escaso número de observaciones que han seguido a la original, cuyos datos fundamentales resumimos en el cuadro adjunto, y que ninguna de ellas fuera acompañada del estudio micológico de los cultivos. Este hecho ha motivado que en los E.E. U.U., donde se ha profundizado el estudio de esta enfermedad, ciertos autores llegaran a dudar de la autenticidad del descubrimiento de Posadas. Transcribimos al respecto algunos párrafos de la publicación de Kessel, J. F. <sup>(2)</sup>: The first case of *Coccidioides* on record is supposed to have been observed in Argentina by Posadas and Wernicke in 1891. However since no subsequent cases have been reported from this aerea one may question whether they actually were dealing with the fungus we now know as *Coccidioides immitis*; y Dodge, C. W. <sup>(3)</sup> en su tratado de "Medical Mycology", dice en la página 148: Unfortunately none of the Argentine organisms has been cultivated so we can't compare cultural characters.

Por otra parte Stiles, G. W. y Davis, C. L. <sup>(4)</sup>, refieren en su estadística 14 casos registrados en la América del Sud, cifra que no hemos podido confirmar.

Nuestro trabajo viene pues, a llenar por primera vez, una sentida necesidad, no solamente para la información bibliográfica de nuestro país, sino también del exterior.

Como puede apreciarse en el cuadro, solamente hemos logrado reunir datos de siete casos observados en la Argentina, dos de los cuales son aún inéditos (casos N° 6 y 7). Este escaso número de

observaciones no nos permite tener una idea exacta de su distribución geográfica y de la sintomatología inicial. Sin embargo, salvo los dos primeros casos cuya puerta de entrada del parásito se ignora o fué aparentemente externa, los restantes parecen haberse iniciado con un cuadro broncopulmonar agudo semejante a la gripe seguido, más tarde, de diseminación metastásica como en las observaciones norteamericanas. <sup>(5-6-7-8)</sup>

En los casos observados se trata de sujetos adultos, entre 20 y 50 años, en contacto con el medio rural y contaminados, al parecer, en tres zonas muy apartadas de nuestro continente, a saber: el Chaco, provincia de Córdoba y Pampa Central.

#### ESTUDIO MICOLÓGICO

El estudio micológico que exponemos a continuación se refiere a los tres cultivos (cepas Nros. 1751, 695 y 695,5 de la micoteca del Instituto Bacteriológico "Malbrán") obtenidos por primera vez en el país.

*En agar sangre* de conejo al 5 % sembrado en caja de Petri e incubado a 30°C, la colonia llega a medir unos 4,5 cm. de diámetro aproximadamente al cabo de ocho días. Es ligeramente saliente, lanosa y de un color blanco sucio con un tinte verdoso, en ocasiones. Zonada o hemizonada (círculos concéntricos con diferente cantidad de micelio aéreo).

*En agar caldo glucosado al 1 %*: el mismo aspecto de la colonia.

En el *medio de Stanford* <sup>(8)</sup>: Las cepas Nros. 695 y 695,5 desarrollaron formando un micelio aéreo fino, lanuginoso, en tanto que la cepa N° 1751 formó una colonia plana, lampiña, casi desprovista de micelio aéreo y con algunas mechas en el centro (funículos).

El estudio de nuestras tres cepas y siete norteamericanas, nos ha permitido comprobar que todas presentan, salvo pequeñas diferencias en relación con el medio de cultivo y la temperatura de incubación, el mismo aspecto.

Forman colonias lanosas y algodonosas en toda su superficie o en el centro, zonadas o hemizonadas, es decir, presentando su micelio círculos concéntricos. En los medios con 1 % de grasa la colonia adquiere un tinte pardusco particularmente por el reverso.

Tenemos la impresión que la cepa N° 1751 ha perdido, en gran parte, la propiedad de formar micelio aéreo, desarrollando, en cambio, funículos debido al tiempo que se la cultiva en los medios artificiales.

*En caldo glucosado*: forman una película gruesa, húmeda y lampiña, sin micelio aéreo y uno o varios copos algodonosos en el fondo.

En el *medio líquido de Stanford* tienden, en cambio, a formar un micelio aéreo escaso.

| Caso número | Autores                                 | Procedencia                    | Edad  |
|-------------|---|--------------------------------|-------|
| 1           | Posadas, A. 1892 (1)                    | Pampa central.                 | 36 a. |
| 2           | Mazza y Parodi,<br>1928 (15)            | Chaco argentino.               |       |
| 3           | Schenna y Mosto,<br>1936 (16)           |                                | 33 a. |
| 4           | Negroni y Villafañe, L.<br>1938 (17)    | Serrezuela (Córdoba).          | 41 a. |
| 5           | Jorge y colaboradores,<br>1946 (18)     | Chaco paraguayo.               | 38 a. |
| 6           | Insausti y colaborado-<br>res (19)      | Córdoba.                       | 24 a. |
| 7           | Basombrío, I. y cola-<br>boradores (20) | Río colorado (Río Ne-<br>gro). | 24 a. |

| Sexo | Lesiones iniciales                       | Cultivos          | Observaciones                             |
|------|--|-------------------|---|
| M.   | Pómulo derecho.                          |                   | Diseminación cutánea por autoinoculación? |
| M.   | Tumor prelaríngeo.                       | No se obtuvieron. |   |
| M.   | Pulmonares con diseminación metastásica. | No se obtuvieron  |   |
| M.   | Broncopulmonares.                        | Cepa 1751.        | Diseminación metastásica.                 |
| M.   | Pie derecho.                             | No se obtuvieron. | Diseminación metastásica.                 |
| M.   | Estado inicial gripal, meningitis.       | Cepa 695.         | Diseminación metastásica.                 |
| M.   | Pulmón y huesos de las extremidades.     | Cepa 696,5.       | Forma metastásica.                        |

*Caracteres microscópicos:* el micelio vegetativo es poco tabicado y de un diámetro muy desigual variando de 1,40  $\mu$  hasta 5  $\mu$  observándose que las ramas finas parten, en ocasiones, de un filamento grueso y se arrollan a su alrededor o forman lazos. Otras veces el micelio varía bruscamente de diámetro como si fuera una cinta que se presentara de frente y de canto.

El micelio vegetativo presenta los siguientes elementos particulares: clamidosporos de 14 a 16  $\mu$  de diámetro intercalares o terminales, micelio en raqueta que mide unas 6  $\mu$  de diámetro en la parte dilatada, apresorios, funículos, anastomosis vegetativas latero-lateral o término-lateral y, en los medio con grasa, esclerotes rudimentarios que llegan a medir 1 a 2 mm. de diámetro.

El micelio de fructificación nace del micelio aéreo y, en su forma característica, comienza con la delimitación de una "proconidia" simple o ramificada, dejando un pedículo de longitud variable tabicado o no, a modo de esporóforo. La "proconidia" se tabica en sentido basípeto y, si es ramificada, el tabicamiento tiene lugar simultáneamente en el eje principal y en las ramas. Los artículos son rectangulares y se diferencian desde el vértice hacia la base en una sucesión de células de las cuales una es fértil y la siguiente abortiva o estéril. La célula fértil tiene los caracteres de un entosporo (thallosporo) y se libera por la ruptura de las paredes de la célula abortiva que funciona como separador. Los entosporos tienen dimensiones que oscilan entre 2,60 x 2,35  $\mu$  hasta 7,20 x 3,50  $\mu$  siendo, comúnmente de 4,50 x 3,50  $\mu$ .

Las cepas Nros. 695 y 695,5 son, prácticamente, idénticas. La cepa N° 1751 tiene, por el contrario, una escasa capacidad de esporulación en relación con su menor tendencia a formar micelio aéreo en casi todos los medios de cultivo. La propiedad de esporular está en íntima relación con la composición del medio, siendo los medios salinos el de Czapeck y el de Stanford los más favorables y el agar glucosado y el agar miel de Sabouraud los menos apropiados, particularmente el último medio de cultivo.

Creemos que estas modificaciones macro y micromorfológicas, a saber, la reducción de la capacidad de formar micelio aéreo y estosporos, están en relación con procesos degenerativos que sufre el hongo por los continuos trasplantes en los medios artificiales de cultivo, particularmente en los medios nitrogenados complejos y azucarados.

#### PROPIEDADES FISIOLÓGICAS

Para efectuar este estudio sembramos las cepas en el medio utilizado en el "Bureau of Animal Industry" para la obtención de la tuberculina, modificado: Asparagina, 7 gr.; cloruro de amonio, 7 gr.;

fosfato hipotásico, 1,30 gr.; citrato de sodio, 0,50 gr.; sulfato de magnesio, 1,50 gr.; citrato de hierro, 0,30 gr.; cerelesa, 10 gr.; glicerina, 25 gr.; agua destilada, 1.000 ml. y, cuando se obtuvo el desarrollo de una película, al cabo de veinte días a un mes de incubación a 28°C., se la molió cuidadosamente en un mortero estéril con arena fina. Este material fué lavado tres veces por centrifugación con solución fisiológica para eliminar los restos del medio de cultivo y el sedimento fué utilizado para el estudio de su fisiología.

*Acción sobre las fuentes de C:* carece de la propiedad de desprender gases pero utiliza, para su vegetación, ciertas fuentes de C de preferencia a otras. Empleamos en estas experiencias el medio de Baker y Smith <sup>(12)</sup> con 0,2 % de cloruro de amonio y 1 % de las siguientes fuentes de carbono: glucosa, levulosa manosa, galactosa, ramnosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trealosa, rafinosa, inulina, dextrina, almidón, arabinol, manitol, glicerol, sorbitol, acetato de sodio, citrato de sodio, oxalato de sodio y tartrato de sodio, disponiendo las experiencias en dos series por duplicado. En la primera serie, el medio fué repartido en tubos inclinados en pico de clarinete y luego sembrados depositando en el centro de cada uno de ellos un asa del material finamente molido, en la segunda serie de experiencias el medio sin fuente de carbono, fundido a 48°C., fué densamente sembrado con la cepa en estudio y vertido en caja de Petri. Una vez el medio solidificado y puesto a secar en la estufa, se dividió el fondo de la caja de Petri en cuatro sectores y se depositó en la superficie del medio, la fuente de C en substancia, vale decir, utilizamos el método auxanográfico de Beijerinck.

Lectura de los resultados: anotamos la intensidad del desarrollo cada cuatro días durante 16 días de incubación a 28°C., midiendo el diámetro de la colonia en la primera serie y la densidad del desarrollo en el método auxanográfico. Los resultados han sido similares.

Todas las cepas estudiadas utilizan mejor los monosacaridos que las pentosas, los di y polisacaridos y los alcoholes. El sorbitol ha sido, en general, mejor utilizado que arabitol, glicerol y manitol. El acetato de sodio es una fuente de carbono tan preferida por las cepas de *C. Immitis* estudiadas como los monosacáridos; en cambio el citrato, oxalato y tartrato de sodio son poco o nada utilizados.

*Utilización del alcohol etílico:* sembramos el material en el medio, líquido mineral con 3 % de alcohol etílico empleado por Stelling-Dekker <sup>(13)</sup> en el estudio de las levaduras. El *C. immitis* utiliza el alcohol etílico como fuente de carbono.

*Acción sobre la celulosa:* empleamos la técnica de Baker y Smith <sup>(12)</sup> comprobando que este hongo se desarrolla muy pobremente o nada cuando la celulosa es la única fuente de C.

*Acción sobre las grasas:* utilizamos en este estudio el medio ya mencionado adicionado al 1 % de manteca, grasa de cerdo, aceite de oliva y ácido oleico, cuando el medio estaba fundido y al 50°C. agitamos insistentemente para emulsionar y lo vertimos en cajas de Petri que fueron inmediatamente colocadas en la cámara fría. Cada caja con estas diferentes fuentes de carbono, fué dividida en cuatro sectores, en cada uno de los cuales se sembró una cepa de *Coccidioides immitis*. Todas se desarrollaron aproximadamente con la misma intensidad y, el examen microscópico del material recogido a nivel de las colonias, nos ha revelado el ataque de las grasas mencionadas, sea por la formación de cristales de ácidos grasos o por la corrosión de los glóbulos de grasa por el desarrollo miceliano.

Las grasas provocan, además, la formación de esclerotes rudimentarios que señalamos en otra publicación, por primera vez.

Hemos estudiado, también, la acción sobre extractos de *Mycobacterium phlei* en la forma siguiente: pesamos 4 lotes de 250 mg. cada uno, de película desecada y finamente molida, y le adicionamos 5 ml. de los siguientes solventes orgánicos: acetona, cloroformo, alcohol 95 % y éter, sometiendo los tres primeros a una breve ebullición y dejándolos todos durante 24 horas en la heladera. Preparamos tubos con 20 ml. de medio de Baker y Smith fundido y a 50°C. y adicionamos 3 ml. de cada uno de los extractos mencionados, agitamos para emulsionar y enfriamos en la cámara fría sembrando, luego, como en las experiencias anteriores.

Todas las cepas se desarrollaron bien en los cuatro extractos, notándose al cabo de una semana la incubación a 28°C. un amplio halo claro alrededor de las colonias desarrolladas en los extractos alcohólico y acetónico.

*Acción sobre las fuentes de nitrógeno:* estas experiencias fueron conducidas en forma análoga a las efectuadas en el estudio de la acción sobre las fuentes de carbono comprobando que la peptona, asparagina, sulfato de amonio, urea y cloruro de amonio son buenas fuentes nitrogenadas para asegurar un amplio desarrollo del hongo en estudio que es más exuberante en el medio peptonado, posiblemente porque la peptona es, además, una buena fuente de C. Se desarrolla menos intensamente en los medios con histidina y nitrato de potasio.

*Acción proteolítica:* ninguna de las cepas se desarrolló en el mosto de cerveza gelatinado. Se desarrollaron bien, en cambio, en el suero de caballo coagulado dirigiéndolo más o menos intensamente según las cepas.

La leche es peptonizada en pocos días.

Reducción de nitratos en nitridos, formación de indol y de  $\text{SH}_2$  de fuente orgánica (suero de caballo coagulado): negativas.

*Producción de hemolisina;* para la sangre de conejo: sembramos las cepas en agar sangre al 5 % en cajas de Petri por duplicado incubando a 28°C y a 37°C. Las cepas Nros. 695 y 695,5, no produjeron hemolisinas y esta acción fué en cambio positiva en la cepa N° 1751.

Temperatura óptima del desarrollo: en la vecindad de los 30°C.

#### RESUMEN

Hasta el presente se han señalado siete casos de coccidioidomicosis en la Argentina, dos de los cuales son aún inéditos. El estudio micológico de tres cepas obtenidas en los casos 4, 6 y 7 nos han revelado que sus caracteres coinciden con los de las cepas norteamericanas. Las colonias son vellosas o lanosas, blancas, zonadas o hemizonadas.

El micelio vegetativo forma clamidosporos, micelio en raqueta, apresorios funículos, anastomosis y, en los medios con 1 % de grasa, esclerotes rudimentarios. El micelio de fructificación nace del micelio aéreo y consiste en la formación de entosporos intercalados entre células vacías que funcionan como separadores.

Utilizan mejor los monosacáridos y el acetato de sodio que otras fuentes de carbono. El cloruro de amonio es la fuente nitrogenada más simple mejor utilizada. Son proteolíticas y algunas cepas hemolisan la sangre de conejo.

#### RÉSUMÉ

On a rapporté jusqu'à présent 7 cas de coccidioidomycose dans l'Argentine, dont deux sont encore inédits. L'étude mycologique de 3 souches nous a révélé qu'elles sont identiques aux souches nord-américaines. Les colonies sont veloutées ou laineuses, blanches, zonées ou hémizonées.

Le mycélium végétatif forme des chlamydo-spores, mycélium en raquette, appressorium, funiculus, des anastomoses végétatives et, dans les milieux avec 1 % de graisse, des sclérotés rudimentaires. Les mycélium de fructification naît du mycélium aérien et consiste dans la formation d'entosporos (thallospores) séparés par des cellules vides qui fonctionnent comme des disjoncteurs.

Elles utilisent mieux les monosaccharides et l'acétate de sodium que les autres sources de carbone. Le  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_4$  est la source d'azote plus simple qui fournit un bon développement du *C. immitis*. Les souches étudiées sont protéolytiques et quelques unes hemolysent le sang du lapin.

#### SUMMARY

Seven cases of coccidioidomycosis have been reported until now in Argentina, 2 of which are not yet published. Mycological characters of the 3 argentine strains are identical with those of the

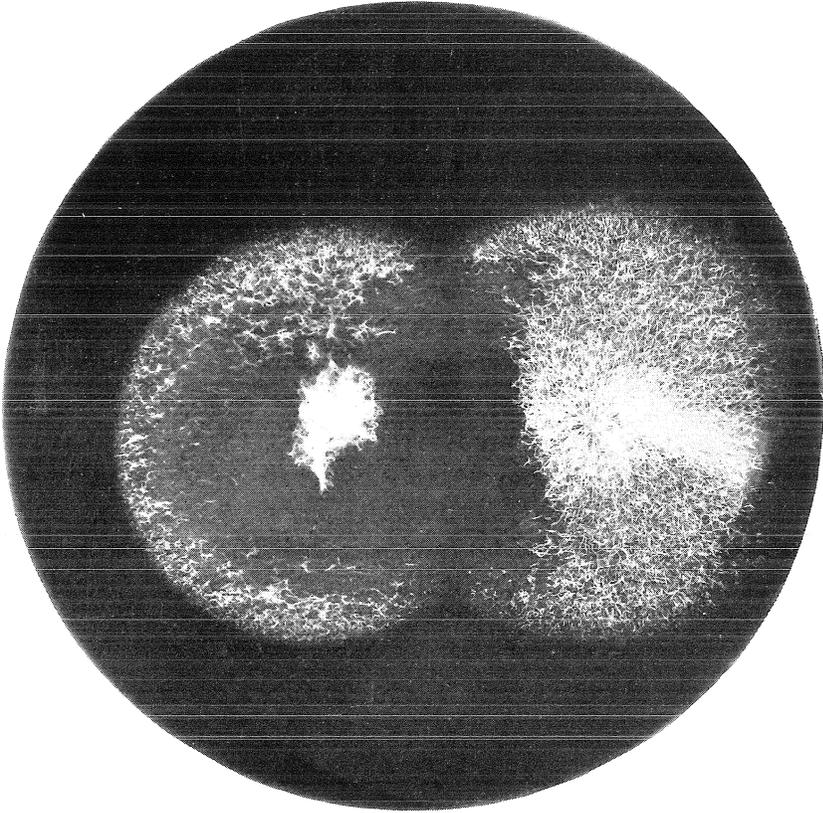


FIG. 1. — Colonias de *Coccidioides immitis*, cepa 1751 en agar-sangre.

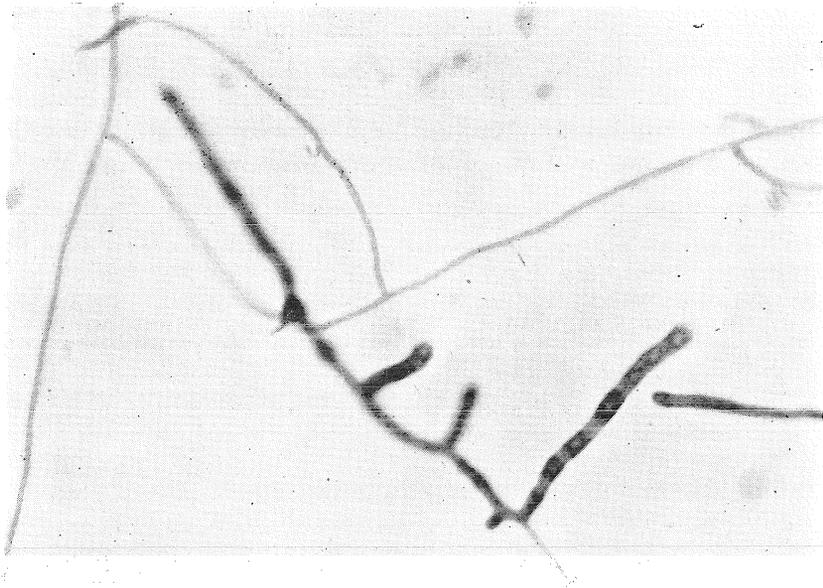


FIG. 2. — Micelio de fructificación en los cultivos. Se aprecia la delimitación de una proconidia ramificada y la formación de entosporos.

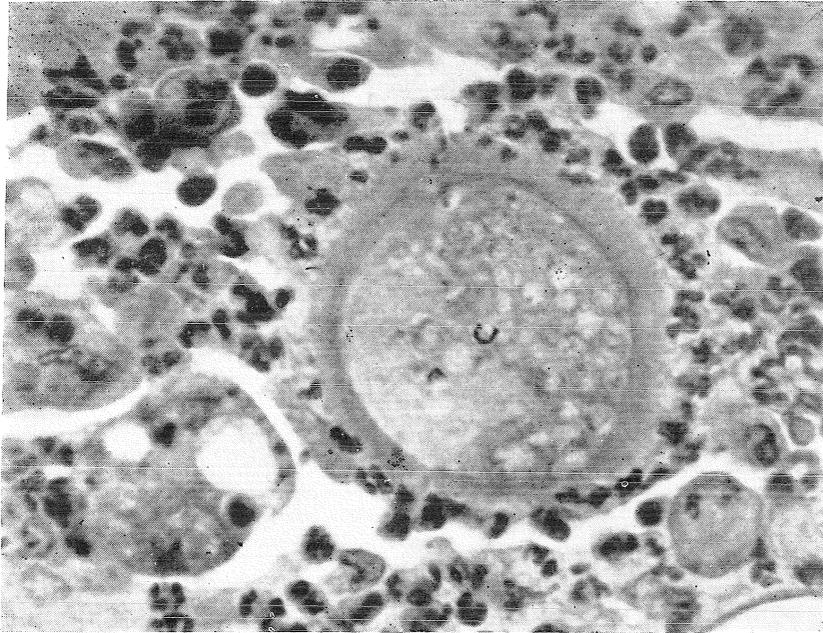


FIG. 3. — Aspecto microscópico del *C. immitis* en las lesiones experimentales del cobayo. Esporangio maduro con endosporos quísticos y formaciones radiadas acidófilas en la membrana peridial.



north-american strains. Colonies are velvety or floccose, white, zonate or hemizonate. Vegetative mycelium forms: chlamydospores (intercalary or terminal), racket mycelium, appressoria, funicula, vegetative anastomosis and rudimentary sclerotia.

Fertil mycelium develops as branches of the aerial mycelium and leads to the formation of entospores (thallospores) separated by empty cells which function as disjunctors. They utilise monosaccharides and sodium acetate better than other carbon sources. Ammonium chloride is the simplest nitrogen source which provides a good growth of *C. immitis*. Argentine strains are proteolytic and one of them hemolyse rabbit's red-blood corpuscles.

Agradecemos muy sinceramente a los doctores Ignacio Basombrío y Julián Prado los datos gentilmente suministrados de los casos N° 6 y 7.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) POSADAS, A.: *Obras completas*. Imprenta de la Universidad. Buenos Aires, 1928, p. 132.
- (2) KESSEL, J. P.: *Am. J. Trop. Med.*, 1941, **21**, 447.
- (3) DODGE, C. W.: *Medical Mycology*. C. F. Mosby Co. St. Louis, 1935.
- (4) STILES, G. W., and DAVIS, C. L.: *J. A. M. A.*, 1942, **119**, 765.
- (5) GIFFORD, M. A.: *Ann Rept. Kern County*. Dept. Pub. Health, 1938-1939, **73**.
- (6) DICKSON, E. C.: *J. A. M. A.*, 1938, **III**, 1362.
- (7) SMITH, E. C. and BAKER, E. E.: *Weekly Bull. Cal. State Dept. Pub. Health*, 1941, **20**, 113 y 117.
- (8) SMITH, E. C.: *The Med. Clinics of N. America*, 1943, **27**, 790.
- (9) SKINNER, C. A., EMMONS, C. W. and TSUCHIYA, H. M.: *Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1947.
- (10) JACOBSON, H. P.: *Fungous discases*. Ch. Thomas. Baltimore, Maryland, 1932.
- (11) STEWART, R. A. and MEYER, K. F.: *J. Inf. Dis.*, 1938, **63**, 196.
- (12) BAKER, E. E. and SMITH, E. C.: *J. Inf. Dis.*, 1942, **70**, 51.
- (13) STELLING-BEKKER, N. M.: *Die sporogenen Hefen*, Uitgave van de Koninklijke Akad. van Wetenschappen Te Amsterdam, 1931.
- (14) NEGRONI, P.: *Morfología y biología de los hongos*. *El Ateneo*, Buenos Aires, 1938.
- (15) MAZZA, S. y PARODI, S.: *Bol. Inst. Clin. Quir.*, Bs. As., 1927, **2**, 909.
- (16) SCHENA, A. T. y MOSTO, D.: *La Semana Med.*, 1935 (2), 1623.
- (17) NEGRONI, P. y VILLAFANE, L.: *Mycopathología*, 1939-1940, **2**, 52.
- (18) JORGE, J. M., NIÑO, F. L. y LATIENDA, R.: *La prensa Med. Arg.*, 1946, **33**, 630.
- (19) INSAUSTI, MATERA y PRADO, J.: Comunicación verbal.
- (20) BASOMBRÍO, I. y colaboradores: Comunicación verbal.
- (21) NEGRONI, P. y RADICE, J. C.: *Rev. Arg. Dermatosisif.*, 1946, **30**, 219.