

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

### IV. Virulencia de las cepas y su relación con los caracteres micológicos

Por P. NEGRONI y D. VIVOLI

En trabajos anteriores nos hemos ocupado del micelio vegetativo y de fructificación del *Coccidioides immitis* y del estudio micológico de 3 cepas autóctonas.

En esta oportunidad hemos investigado si existen diferencias en la virulencia para el cobayo de las cepas autóctonas y norte americanas que puedan referirse a ciertos caracteres macro y micromorfológicos de los cultivos, como ser riqueza de micelio aéreo y de esporulación y aspecto microscópico del parásito en las lesiones (formación de endosporos poliédricos y quísticos).

*Cepas empleadas:* N° 691: Procedente del "Department of Agriculture" de Washington (año 1929) con la nota: Chicago, laboratorio de Miss Church.

N° 692 : Aislada del vacuno por Gillman, "Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry" de Washington.

N° 694 : Procedente del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro con la nota Blastomicosis, Chicago, Dr. Ota (año 1921).

N° 695 : Aislada del líquido céfalo-raquídeo de un caso argentino de coccidioidomicosis metastásica (Inst. Bact. "Malbrán", Bs. Aires).

N° 696 : Cepa Conant (819) Duke University, U. S. A., recibida del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro.

N° 696,1: Cepa Conant (794) Duke University, U. S. A., recibida del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro.

N° 696,2: Cepa Conant (800) Duke University, U. S. A., recibida del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro.

N° 696,3: Cepa Conant (798) Duke University, U. S. A., recibida del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro.

N° 696,4: Cepa Conant (799) Duke University, U. S. A., recibida del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro.

N° 696,5: Aislada del material extraído de lesiones óseas metastásicas en un caso argentino (Inst. Bacteriológico "Malbrán", Bs. Aires).

N° 1751 : Aislada de pus de abscesos metastásicos en un caso argentino (Instituto Bacteriológico "Malbrán", Buenos Aires).

Presentado en la reunión de comunicaciones del 13 de julio de 1948.

## TÉCNICA UTILIZADA

Las cepas mencionadas fueron cultivadas en el medio líquido utilizado en el "Bureau of Animal Industry" de los EE. UU. ligeramente modificado: Asparagina, 5 g.; Cloruro de amonio, 7 g.; Fosfato bipo-tásico, 1,3 g.; Citrato de sodio, 0,50 g.; Sulfato de magnesio, 1,50 g.; Citrato de hierro, 0,30 g.; Glucosa pura anhidra, 10 g.; Glicerina, 10 g.; Agua destilada c. s. p., 1000 ml.

(Se disolvió aparte el cloruro de amonio y el citrato de hierro).

Este medio fué repartido en frascos de Povitzky para obtener una amplia película, la cual se extrajo al cabo de un mes de incubación a 28°C.

Las películas micelianas fueron molidas detenidamente en morteros estériles y después de adicionar solución fisiológica estéril, se aspiró el material con jeringa provista de una aguja gruesa (calibre 20-10), se centrifugó y el sedimento se escurrió sobre papel de filtro esterilizado y pesó en balanza de precisión. Se inocularon lotes de cobayos del mismo peso aproximadamente con 1 y 10 miligramos de cada cepa.

## RESULTADO DE LAS INOCULACIONES

Cobayos inoculados con la *cepa 691*: Se inocularon 4 cobayos cuyos pesos respectivos oscilaban entre 400 g. y 500 g. *por vía peritoneal con 1 mg.* de material de cultivo, del cual se obtiene por molienda una papilla homogénea. Todos murieron en un plazo que varió de 27 días (cobayo de 500 g.), hasta 155 días (cobayo de 475 g.). Dos cobayos presentaron nódulos en la cavidad abdominal y en todos los órganos, incluyendo pulmones y testículos, y otros dos, únicamente en la pared peritoneal y órganos abdominales. El estudio histopatológico permitió comprobar en todos ellos la presencia del parásito en diversos grados de su evolución hasta llegar a la formación de esporangios con endosporos poliédricos sin laguna central y de endosporos quísticos. Estos dos aspectos están presentes en la misma lesión.

Los dos cobayos (de 370 y 445 g. de peso respectivamente) fueron inoculados *por la vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. El primero murió a los 59 días y el segundo al cabo de dos meses y 18 días, presentando ambos, lesiones generalizadas, cuyo estudio microscópico reveló la presencia del parásito con los mismos caracteres que en el lote anterior de cobayos.

Cobayos inoculados con la *cepa 692* de molienda difícil (proporciona una papilla grumosa): 4 inoculados *por la vía peritoneal con 1 mg.*, variando sus pesos respectivos entre 345 y 710 g. Un cobayo permanece aún vivo y los 3 restantes murieron en un lapso compren-

didido entre 20 días (cobayo de 345 g.), y 3 meses y 9 días (cobayo de 710 g.). En un cobayo no se le practicó la autopsia, y en los dos restantes no se observaron lesiones macroscópicas.

*Dos cobayos* de 345 y 440 g. respectivamente fueron inoculados por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. Ambos sobreviven (más de 6 meses).

Cobayos inoculados con la *cepa 694* de molienda difícil. *8 cobayos* fueron inoculados por la *vía peritoneal con 1 mg.* de material de cultivo. Los pesos de estos animales fueron de 365 g. a 630 g. Dos cobayos únicamente murieron: uno al cabo de 12 días presentando un nódulo caseoso en testículo y un nodulito en el bazo. La observación microscópica de estas lesiones acusó la existencia de elementos parasitarios muy escasos, globulosos y sin endosporos. El otro cobayo murió al cabo de 1 mes y 20 días sin lesiones visibles.

*Dos cobayos* de 370 y 400 g. respectivamente, fueron inoculados por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. Ambos sobreviven.

Tres cobayos de 500 g. de peso, aproximadamente, fueron inoculados por la *vía intratesticular* sin presentar lesiones aparentes al cabo de dos meses.

Cobayos inoculados con material de cultivo de la *cepa 695* que proporciona una papilla homogénea: *2 cobayos* de 420 g. y 470 g. respectivamente, por la *vía peritoneal con 1 mg.* Ambos murieron al cabo de 26 días con lesiones en la pared peritoneal y vísceras abdominales el primero, y generalizadas el segundo. La observación microscópica de los cortes de las lesiones acusó la presencia del parásito en diversos grados evolutivos. En la misma preparación se puede apreciar la presencia de esporangios con endosporos poliédricos (ameboides de Posadas), otros con endosporos quísticos; existiendo entre ambas formas extremas todos los estados intermedios. Algunos esporangios del primer tipo poseen una laguna central.

Se inocularon *dos cobayos* de 365 y 410 g. de peso respectivamente por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. El primero murió 27 días después con lesiones en testículo, peritoneo y vísceras abdominales, y el segundo con lesiones generalizadas al cabo de 28 días. El parásito presentaba en las lesiones el mismo aspecto que el descrito en el lote anterior.

Cobayos inoculados con la *cepa 696* que proporcionó una papilla homogénea: *Dos cobayos* de 320 y 345 g. por la *vía peritoneal con 1 mg.* Ambos sobreviven al cabo de 6 meses. Se inocularon otros dos cobayos de 265 g. y 495 g. respectivamente, por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. El primero murió a los 3 días, presentando en la autopsia, nodulitos en los órganos abdominales y conges-

ción de la pared peritoneal. El segundo cobayo murió al cabo de 48 días presentando nódulos en el peritoneo parietal.

Cobayos inoculados con material de cultivo de la cepa 696,1 que proporcionó una papilla homogénea: 4 cobayos de 355 a 365 g. de peso fueron inoculados por la *vía peritoneal con 1 mg.* de material. Un cobayo murió al cabo de 3 meses y  $\frac{1}{2}$  con lesiones generalizadas cuyo estudio histológico acusó la presencia del parásito con endosporos poliédricos sin laguna central y esporangios con endosporos quísticos. Otro cobayo fué sacrificado al cabo de 3 meses y 22 días presentando, en la autopsia, nódulos en el bazo y un absceso en el páncreas. La observación de los cortes histológicos permitió comprobar la presencia de *parásitos sin endosporos*.

Se inocularon otros 2 cobayos por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. Uno (de 330 g. de peso) murió al cabo de 3 meses y 10 días con lesiones en los testículos, pared peritoneal y órganos abdominales, con escasos parásitos. El otro cobayo de 445 g. sobrevive al cabo de 6 meses.

Cobayos inoculados con el material de cultivo de la cepa 696,2 que proporcionó una papilla homogénea: 2 cobayos de 320 y 345 g. de peso respectivamente, fueron inoculados por la *vía peritoneal con 1 mg.* El primero murió al cabo de 2 meses y 10 días con lesiones testiculares conteniendo parásitos jóvenes y adultos. Estos últimos con endosporos poliédricos y quísticos.

El otro cobayo sobrevive (más de 6 meses).

Dos cobayos de 325 y 340 g., respectivamente, fueron inoculados por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. El segundo sobrevive, y el primero murió al cabo de 13 días presentando, en la autopsia, nódulos en el epiplón conteniendo parásitos adultos con endosporos quísticos y otros con endosporos poliédricos sin laguna central.

Cobayos inoculados con material de cultivo de la cepa 696,3 que proporcionó una papilla homogénea: 4 cobayos de 430 a 480 g. de peso fueron inoculados por la *vía peritoneal con 1 mg.* Un cobayo sobrevive aún (más de 6 meses de observación), dos murieron al cabo de 62 y 74 días respectivamente con lesiones en la pared peritoneal y órganos abdominales en las cuales existían parásitos jóvenes y adultos conteniendo, estos últimos, endosporos quísticos y poliédricos sin laguna central.

Finalmente, otro cobayo murió al cabo de 4 meses y 6 días presentando en la autopsia, lesiones testiculares, en la pared peritoneal y vísceras abdominales. En la observación de los cortes histológicos, únicamente, pudo apreciarse la existencia de escasos parásitos sin endosporos.

*Dos cobayos* de 395 y 410 g. de peso, respectivamente, fueron inoculados por la *vía peritoneal con 10 mg.* de material de cultivo. Ambos murieron a los 40 días con lesiones en la pared peritoneal y órganos abdominales. Éstas contenían parásitos jóvenes y adultos, conteniendo, estos últimos, endosporos poliédricos sin laguna central.

Cobayos inoculados con la *cepa 696,4* cuyo material de cultivo fué de molienda difícil. *Dos* de 490 y 500 g., respectivamente, fueron inoculados por la *vía peritoneal con 1 mg.* Un cobayo murió al cabo de 37 días con lesiones en los testículos, pared peritoneal y órganos abdominales, en las cuales existían parásitos jóvenes y adultos conteniendo, estos últimos, endosporos poliédricos sin laguna central. El otro murió al cabo de dos meses presentando, en la autopsia, derrame peritoneal y nodulitos en el bazo en los cuales el parásito tenía el mismo aspecto que en el cobayo anterior.

*Dos cobayos* de 385 y 415 g., respectivamente, inoculados con 10 mg. El primero murió 84 días después con lesiones generalizadas y, el segundo cobayo, al cabo de 3 meses y 12 días, con lesiones en los testículos, peritoneo parietal y órganos abdominales. Los parásitos adultos observados en estas lesiones contenían endosporos poliédricos sin laguna central y endosporos quísticos.

Cobayos inoculados con material de cultivo de la *cepa 696,5* que proporcionó una papilla homogénea: Se inocularon *4 cobayos* de unos 400 g. aproximadamente, por la *vía peritoneal con 1 mg.* Uno murió 9 días después, y otro, al cabo de 50 días sin lesiones macroscópicas. Los otros dos cobayos sobreviven aún.

*Dos cobayos* fueron inoculados con el *material obtenido de las lesiones* que presenta el enfermo. Uno murió al cabo de 14 días, y el otro, a los 36 días, con lesiones en los testículos, pared peritoneal y órganos abdominales. Los parásitos adultos observados en estas lesiones contenían endosporos quísticos y poliédricos sin laguna central.

Cobayos inoculados con material de cultivo de la *cepa 1751* de molienda difícil: *4 cobayos* (de 385 g., 460 g., 470 g. y 350 g.) fueron inoculados, como en los casos anteriores, por la *vía peritoneal con 1 mg.* El tercero murió al cabo de 4 meses y  $\frac{1}{2}$ , presentando, en la autopsia, un derrame peritoneal hemorrágico, y los restantes, a los 70 días, más o menos (entre 66 y 74 días), con lesiones en la pared peritoneal y órganos abdominales los dos primeros, y generalizadas, el último. Los parásitos adultos observados en los cortes histológicos contenían endosporos quísticos y poliédricos sin laguna central.

*Dos cobayos* de 365 y 380 g. de peso, respectivamente, fueron inoculados con 10 mg. de material de cultivo. El primero murió al cabo de 64 días, con lesiones generalizadas, y el segundo, 100 días después de la inoculación, con lesiones en el peritoneo parietal y órganos abdominales.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Hemos probado la virulencia de 11 cepas de *C. immitis*, 3 autóctonas y 8 norteamericanas, habiendo inoculado un total de 65 cobayos.

La virulencia de las cepas estudiadas es irregular. Para una misma cepa no hemos podido apreciar que exista relación entre el tiempo de muerte y extensión de las lesiones y la cantidad de material inoculado por unidad de peso. Cobayos de un peso aproximadamente igual sobrevivieron o murieron más tardíamente con la inoculación de 10 mg. de material de cultivo y no resistieron, en cambio, a la de 1 mg., por ejemplo.

Salvo la cepa 694, de la cual nos ocuparemos después, no hemos notado relación de virulencia con ciertas particularidades micológicas, como ser, la riqueza en entosporos y la facilidad de molienda. Las cepas n<sup>o</sup> 692 y 696, que producen abundantes entosporos, son poco patógenas para el cobayo; la cepa 1751, que tiene en los cultivos escasa tendencia al desarrollo de micelio aéreo y de entosporos, ha conservado, sin embargo, su acción patógena experimental. La cepa autóctona 695 se ha revelado la más virulenta para el cobayo inoculado por vía peritoneal.

Tampoco hemos podido establecer relación alguna entre el tiempo de muerte, la difusión de las lesiones y el aspecto microscópico del parásito en las mismas.

El material obtenido de las lesiones humanas se ha revelado en la cepa 696,5, más virulento para el cobayo que el de los cultivos, pero este tema será objeto de un estudio más riguroso.

La cepa 694 es poco o nada patógena para el cobayo, pero el estudio micológico y biológico de la misma, ha revelado tratarse de un hongo diferente cuya fructificación conidial pertenece al género *Scopulariopsis*.

La mayor o menor resistencia que presentan los cobayos a la infección experimental por *C. immitis*, parece estar en relación, ante todo, con factores individuales y, secundariamente, con los del cultivo empleado.

## SUMMARY

We have tried the pathogenic power for guinea-pigs of 3 argentine and 8 north-american strains of *C. immitis*. The virulence of these strains is irregular. The survival time and the extension of the lesions are not related to the quantity of the inoculum per weight unity. We could neither find any relation between pathoge-

nicity and any particular mycological characteristic of the parasite in the cultures, such as quantity of aerial mycelium and of the entospores, or in the lesions.

The strain 694 (Scopulariopsis-type) is almost devoid of pathogenic power for guinea pigs.

#### RÉSUMÉ

Nous avons essayé la virulence pour le cobaye de 11 cultures de *C. immitis*, dont 3 sont autochtones et 8 nordaméricaines. La virulence de ces souches est irrégulière, puisque le temps de mort et l'extension des lésions, ne sont pas en relation avec la quantité de culture inoculée par unité de poids. Nous n'avons pu, non plus, relier la virulence avec des caractères particuliers des cultures (degré de production de mycélium aérien et d'entospores) ou de l'aspect du parasite dans les lésions.

La souche 694 (type Scopulariopsis) est dépourvue presque complètement de pouvoir pathogène pour le cobaye.

#### BIBLIOGRAFÍA

- (1) NEGRONI, P.: Estudios sobre el *Coccidioides immitis*, Rixford et Gilchrist. I. Micelio vegetativo y de fructificación. *Rev. Arg. Dermatología*, 1948. (En prensa).
- (2) NEGRONI, P.: Estudios sobre el *Coccidioides immitis*, Rixford et Gilchrist. II. Revisión del granuloma coccidioidal en la Argentina y estudio micológico de 3 cepas autóctonas. *Rev. Arg. Dermat.*, 1948. (En prensa).
- (3) NEGRONI, P.: Estudio sobre el *Coccidioides immitis*, Rixford et Gilchrist. III. Estudio micológico comparativo de las cepas argentinas y norteamericanas. *Rev. Arg. Dermat.*, 1948. (En prensa).
- (4) NEGRONI, P., y RADICE, J. C.: A propósito de *Pseudococcidioides Mazzai*, Fonseca, 1928, y de *Trichosporon proteolyticum*, Negroni y Villafañe Lastra, 1939. *Rev. Arg. Dermat.*, 1946, 30, 219.
- (5) NEGRONI, P., y RADICE, J. C.: La formación de endosporos en el *Coccidioides immitis*, observado con la luz de Wood. Su posición sistemática. *Rev. Arg. Dermatosis*, 1947, 31, 573.
- (6) BAKER, E. E., y SMITH, C. E.: *The J. Inf. Dis.*, 1942, 70, 51.
- (7) BAKER, E. E., MRAK, E. M., y SMITH, C. E.: *Farlowia*, 1943, 1 (2), 199.
- (8) EMMONS, C. W.: Biology of *Coccidioides immitis*, in *Biology of pathogenic fungi* edited by W. J. Nickerson. (*Ann. Crypt. et Phytopath.*, 1947, vol. 6, 71).