

Pseudallescheria sheari n. gen., n. sp. aislada de un paramicetoma de la rodilla

Por P. NEGRONI e I. FISCHER

(Con 7 figuras)

En el mes de Septiembre del año pasado, uno de nosotros (Fischer), sembrando el líquido purulento extraído asépticamente de una tumoración existente a nivel de la rodilla derecha de un paciente internado en el Pabellón II del Hospital Rawson, servicio del Profesor Dr. E. Finochietto, obtuvo el desarrollo de un hongo filamentososo, cuyo estudio motiva el presente trabajo.

La observación clínica detallada será publicada oportunamente por el Dr. H. Hermann, quien ha seguido cuidadosamente la evolución del enfermo, cuyo padecimiento se instaló a consecuencia de un accidente.

Recordaremos que M. F. Boyd estudió en Norte América, en el año 1921, un micetoma podal del cual aisló un hongo que fué clasificado por Shear como *Allescheria boydii*; hongo éste estrechamente relacionado al que nos ocupa.

Durante veinte años no se registró en ningún país del mundo otra observación semejante. Este sería, pues, el segundo caso; pero, como la especie aislada tiene caracteres botánicos (morfológicos y biométricos) diferentes de la especie descrita por Shear, hemos decidido crear un género nuevo: *Pseudallescheria*, dedicando la especie al eminente investigador norteamericano.

Que el hongo en cuestión era realmente el agente de la tumoración articular lo prueba el hecho de que el pus sembrado fué extraído de una lesión cerrada y que el enfermo curó rápidamente con el tratamiento yodado bien instituido.

CARACTERES MACROMORFOLÓGICOS

Agar-caldo glucosado.— La siembra del líquido articular sobre este medio, dió lugar a la vegetación de un hongo filamentososo bien visible al cabo de 5 días de incubación a 37° y que, más tarde,

Presentado para publicar el 20 de julio de 1943.

cubrió toda la superficie del medio. Su aspecto es veloso y su color grisáceo.

Agar-mosto de cerveza. — Al cabo de 20 días a 30° el desarrollo se extiende sobre toda la superficie del medio; es veloso, de color ratón y presenta esbozos de zonación. En la parte central existen varias gotitas parduseas y gran cantidad de puntitos negros (peritecios) a lo largo de los bordes.

Agar-miel de abejas. — Colonia velosa de color gris verdoso con bordes más claros. Por el reverso existe una débil pigmentación verde pardusea. Al cabo de seis semanas se observan algunos granitos (peritecios) a lo largo de los bordes del medio de cultivo.

Papa glicerizada. — Al cabo de 20 días de incubación a 30° el desarrollo cubre casi toda la superficie del medio y es de un color gris ratón y contiene numerosas gotitas incoloras o ligeramente acarameladas. Los bordes presentan una pigmentación negra y gran cantidad de peritecios. Al cabo de 1 mes todo el cultivo presentaba una coloración negra.

Zanahoria. — Desarrollo veloso color gris ligeramente verdoso que se torna negruzco y cubierto de gotitas incoloras, hacia los veinte días. Se ven numerosos puntitos como granitos de pimienta (peritecios). Al cabo de 1 mes el color negro es bastante acusado.

Agar Czapek. — Desarrollo veloso gris en los bordes y más oscuro en el centro a cuyo nivel existe una gotita de líquido. Numerosos peritecios superficiales en los bordes.

Caldo glucosado. — Película velosa dejando el líquido claro.

Mosto de cerveza. — Forma una película y un anillo ancho de color pardo verdoso. Esta película cae fácilmente al fondo. El medio no se enturbia.

CARACTERES MICROMORFOLÓGICOS

Cultivos por adhesión en mosto gelatinado. — Los esporos germinan a las 48 horas de incubación a temperatura ambiente (unos 25°), generalmente con un solo tubo ancho que sale cerca de la faceta plana del esporo y que pronto se ramifica. Los filamentos son hialinos, tabicados ramificados y lisos de 2 a 3,7 μ de diámetro. Los conidióforos no tardan en aparecer y son de diferentes longitudes de 2,8 a 3,7 $\mu \times$ 1,87 μ llegando raramente hasta 18 $\mu \times$ 2 μ .

Cada esporóforo origina una sola conidia de la cual se separa por tabique. Las conidias son generalmente piriformes con una faceta plana de implantación, pigmentadas y de paredes lisas, midiendo desde $6,2 \times 5,6 \mu$ hasta $14 \times 7,4 \mu$. A menudo presentan uno o varios glóbulos de grasa en su interior. Ocasionalmente se observan esporos cilíndricos o estalagmoides de $12,87 \times 3,74 \mu$ (fig. 7). Las conidias desprendidas están provistas, con frecuencia, de un collar en la base.

Examinando un *cultivo de agar mosto* hemos comprobado la existencia de cortos esterigmas de $2 \times 2 \mu$ y esporóforos que llegan a medir hasta $19 \times 2 \mu$.

En ocasiones el esporóforo presenta un verticilo de esterigmas como en los *Penicillium monoverticillata* (fig. 7) o varios, escalonados, como en el *Verticillium*.

En zanahoria se observa hacia el quinto día de incubación a 30° la formación de coremios y, unos cinco días más tarde, la de peritecios.

Los órganos sexuales se forman en zanahoria hacia los 7 días de incubación a 30° y solamente hemos podido reconocerlos en el material fijado, incluido y coloreado por la hematoxilina férrica. El ascogonio es helicoidal. El anteridio es un filamento mucho más estrecho, recto y recorre a manera de eje el paso de rosca que describe el ascogonio. Ambos elementos nacen de la misma hifa o de hifas muy vecinas y terminan habitualmente a un mismo nivel; solamente en ocasiones pudimos apreciar que el anteridio sobrepasaba ligeramente el vértice del ascogonio; pero bien pudiera deberse este hecho a que el ascogonio estaba aun en crecimiento. Nunca hemos podido apreciar la existencia de fenómenos de copulación y, creemos, que el ascogonio evoluciona partenogénicamente, ensanchando su diámetro, tabicándose y rodeándose rápidamente de la envoltura peridial (fig. 4, 5 y 7).

Los peritecios son oscuros, casi negros, cuando se los ve a simple vista. Ejerciendo una suave presión sobre el cubreobjeto, se los aplasta y estallan con facilidad. El peridio es delgado, liso y formado por un pseudoparénquima pigmentado. Los peritecios son superficiales, globulosos, sin ostiolo y miden de 100 a 200 μ de diámetro.

Las hifas ascógenas dan nacimiento a ascos irregularmente distribuidos, piriformes, de membrana delgada y lisa. Miden de $21,06 \times 11,7 \mu$, contienen 8 ascosporos y son efímeros, pues cuando el peritecio está maduro sólo contiene ascosporos en su interior. Ade-

más la maduración no es simultánea, sino sucesiva, pues los cortes de un peritecio revelan ascos en diversos estados de desarrollo y también ascosporos libres. Estos son elípticos cortos u ovales con ambos polos ligeramente agudos, presentan una depresión semicircular central o excéntrica que se llena con una burbuja de aire muy refringente y miden de $7,02 \times 3,51 \mu$ a $7,4 \mu$. Su membrana es lisa y pardusca y germinan por un solo tubo que emiten por uno de los polos.

CITOLOGÍA

El vacuoma tiene los caracteres que este sistema presenta en la generalidad de los hongos. Las vacuolas son pequeñas globulosas y pobres en agua en el extremo de los filamentos en crecimiento y en los esporos. Son grandes y ocupan casi todo el diámetro de los filamentos más viejos. Son, entonces, más ricas en agua y presentan uno o varios corpúsculos animados de vivos movimientos brownianos.

El rojo neutro hace precipitar la metacromatina en su interior, la cual se fija más tarde a la pared de la vacuola, haciendo hernia en ocasiones hacia el protoplasma y redisolviéndose, finalmente, en el jugo vacuolar al cual comunican un tinte rosado.

Grasas. — Tanto los filamentos cuanto los esporos contienen glóbulos de substancias grasas que se tiñen por el Sudan III y reducen el ácido ósmico. Estos glóbulos son finos en los filamentos y más gruesos en los esporos.

Glucógeno. — No hemos podido revelar su presencia en los filamentos, en cambio se acumula en gruesos glóbulos en las conidias.

Condrioma. — No es visible al estado fresco sin coloración alguna, pero se lo puede apreciar nítidamente utilizando la coloración vital con verde Janus o el violeta de Dahlia. El condrioma es filamentosos y sufre con facilidad la transformación vesiculosa.

En el material fijado por el método de Meves modificado y coloreado por la hematoxilina férrica, el condrioma se presenta como filamentos a veces ramificados, tanto en el micelio como en las conidias y ascosporos. En estos últimos elementos parece, con frecuencia, irradiar del núcleo.

El condrioma puede presentarse en los esporos bajo la forma de cortos bastones, pero en los artículos del micelio vegetativo es, generalmente, filamentosos.

Núcleos.— Todos los elementos son uninucleados: los artículos de los filamentos, las conidias y los ascosporos. El núcleo es globuloso, excéntrico, provisto de un pequeño nucleolo intensamente teñido, adherido a la membrana nuclear y de un amplio espacio claro ocupado, seguramente, por la cariolinfa.

No hemos podido apreciar la existencia de red cromática, así como tampoco hemos podido observar los fenómenos nucleares de los órganos sexuales y los que tienen lugar en el interior del asco.

CARACTERES FISIOLÓGICOS

La temperatura óptima para el crecimiento vegetativo es de 37° y la de 30° para la formación de los peritecios.

Zimograma de la glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa y rafinosa: negativo.

Auxanograma de los azúcares mencionados: todos positivos.

Auxanograma del nitrógeno: Peptona, asparagina y sulfato de amonio positivos, cuya intensidad guarda relación con el orden mencionado. Es positivo débil para el nitrato de potasio y negativo para la urea.

Desarrolla bien en un medio sintético con 3 por mil de alcohol etílico.

No desprende SH₂.

No licúa la gelatina (mosto gelatinado) al cabo de 6 semanas.

Leche: desarrolla bien, coagulándola y peptonizando completamente el coágulo al cabo de 6 semanas.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL

Carece de acción patógena experimental para los animales de laboratorio. Hemos inoculado, sin resultado alguno, cavia por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal e intratesticular con abundante material de cultivos, bien triturado, así como ratas blancas por vía intratesticular e intraperitoneal.

Pensando que las repetidas inoculaciones en un mismo lugar pueden sensibilizar al tejido y permitir la acción patógena de este hongo, inyectamos material de cultivos suspendido en solución fisiológica, tres veces con 3 a 4 días de intervalo a tres cavia: uno por vía intramuscular, otro por vía intraperitoneal y el tercero por vía testicular, sin obtener tampoco resultado alguno. El material se reabsorbió sin enfermarlos.

REACCIONES SEROLÓGICAS

Las reacciones de aglutinación efectuadas con una suspensión de esporos y las de fijación del complemento y precipitación empleando como antígeno un extracto del hongo filtrado y límpido, fueron negativas, tanto en las reacciones en las cuales utilizamos el suero, como aquellas, con el líquido articular, centrifugado, del paciente.

POSICIÓN SISTEMÁTICA

Por los caracteres expuestos nuestro hongo pertenece, según Clements y Shear (The Genera of Fungi, 1931) al orden *Perisporiales* de los *Ascomycetes* que se diferencia de los *Gymnoascales* por poseer verdaderos peritecios, con un peridio bien formado.

La familia *Eurotiaceae* de los *Perisporiales* tiene, según los autores mencionados, los siguientes caracteres: « Micelio abundante con peritecios típicos, de pared plectenquimatosa o membranosa, formada por regla general por placas poligonales. Los peritecios se rompen en el vértice al llegar a la madurez y, solamente en el género *Micrascus*, poseen ostiolo. Carecen de parafises y los ascos son globulosos o claviformes ». Contiene dos secciones *Hyalosporae* y *Phaeosporae*, de las cuales únicamente la primera nos interesa.

Sección *Hyalosporae*: Ascospores unicelulares globoides u oblongos, hialinos o subhialinos.

- A. Peritecios de colores vivos, amarillentos o rojos, raramente blancos.
1. Con setas o pelos.
 - a. Con setas largas y rígidas, ascospores lenticulares *Chaetotheca*
 - b. Con pelos blandos, ascospores espinosos, globoides y rojizos *Aphanascus*
 2. Peritecios lisos o lampiños.
 - a. Ascospores verrugosos *Anixiopsis*
 - b. Ascospores lisos o con surcos pero no verrugosos.
 - (1). Peritecios con una estrangulación anular en la base *Dichlaena*
 - (2). Peritecios que generalmente se desmenuzan *Eurotium*
- B. Peritecios pardos, púrpura oscuro o negros con la edad.
1. Ascospores con un apéndice irregularmente foliáceo *Samarospora*
 2. Ascospores no apendiculados.
 - a. Peritecios pardos y finalmente negros, con parafises, ascospores globoides *Mycogala*
 - b. Peritecios pardo negruzcos, sin parafises, ascos y ascospores globoides *Pseudeurotium*

- c. Peritecios pardo negruzcos, sin parafises, ascos piriformes y ascosporos ovales *Pseudallescheria*
 d. Peritecios púrpura acentuado, placas del peridio con suturas, carecen de parafises. Ascosporos en forma de habichuela *Fragosphaeria*

El género *Allescheria* fué creado por Saccardo y Sydow, en 1899 en homenaje a Allescher, micólogo alemán, llevando como sinonimia el de *Eurotiopsis* Constantin, 1897. « Perithecia globulosa, minuta tenui membranacea. Asci globosi. Sporidia ovata, utrinque acuta, conidia catenulata, in sporophoris acrogena, dein ob ramulum lateralem (dein apice conidiophorum) compressa ». Clements y Shear lo identificaron, probablemente, al género *Eurotium* Link, 1824.

Van Beyma thoe Kingma en 1937 creó el género *Pseudeurotium* que, además de los caracteres ya mencionados en el cuadro, produce conidias acrógenas o pleurógenas, sesiles o sobre esporóforos, únicas o formando cúmulos de 2 a 4 elementos.

Nuestro hongo presenta parentesco con los géneros *Allescheria* y *Pseudeurotium*, diferenciándose de ambos por sus ascos piriformes y efímeros, sus conidias acrógenas y únicas provistas de un collar cuando se desprenden y por no formar nunca cadenas ni cabezuelas. Por estos motivos hemos creado un género nuevo.

Pseudallescheria n. gén. « I. Perithecia globulosa, parva, glabra, et fusconigra, gracilis peridii. Paraphyses absentes. Asci irregulariter dispositi, piriformes, ephimeri, cum 8 ascosporis unius cellulae, ovali aut elliptici, breves, lenis membranæ. II. Picnidia adhuc ignota. III. Conidiæ piriformes cum facie implantationis plana, unius cellulae, acrogenæ et unicæ. Sporophoris simplices aut ramificati, separati aut in coremiis ».

Pseudallescheria n. gén. « I. Peritecios globulosos, pequeños, de peridio delgado, lampiños y pardonegruzcos. Ascospores dispuestos irregularmente y efímeros con 8 ascosporos unicelulares ovales o elípticos cortos de membrana lisa. II. Picnidios desconocidos. III. Conidias piriformes con faceta plana de implantación, unicelulares, acrógenas y únicas. Esporóforos simples o ramificados, aislados o en coremios ».

Pseudallescheria sheari n. sp. « I. Perithecia superficialia globosa, plurima, fusconigra, 100 ad 200 μ diametri, lenis ac gracilis peridii. Paraphysibus carent. Asci ephimeri, piriformes, tenium leniumque parietum, $21 \times 11,5 \mu$ irregulariter dispositi. Ascosporis elliptici breves aut ovales, utrisque polis acutis, lenis membranæ leviterque fuscae 7 ad 10 \times 3,5 ad 7,4 μ . III. Conidiæ fusculae piri-

formes, lenis membranæ, unius cellulæ, acrogenæ et unicæ cum una facie plana implantationis, monilis munitæ, 6,2 ad 14 \times 5,6 ad 7 μ dimensionis. Sporophori simplices aut ramificati (Typus *Penicillii* aut *Verticillii* separati aut in coremis).

Pseudallescheria sheari n. sp. « I. Peritecios superficiales numerosos pardonegruzcos de 100 a 200 μ de diámetro de peridio delgado y liso. Carecen de parafises. Ascospores efímeros piriformes de paredes delgadas y lisas de 21 \times 11,5 irregularmente dispuestos. Ascospores ovales o elípticos cortos con ambos polos agudos, de membrana lisa y ligeramente pardusca de 7-10 \times 3,5-7,4 μ . III. Conidias parduscas, piriformes y de membrana lisa, unicelulares, acrógenas, únicas con una faceta plana de implantación y provistas de collar. Miden de 6,2 a 14 \times 5,66-7,4 μ . Esporóforos simples o ramificados (tipo *Penicillium* o *Verticillium*), aislados o en coremios ».

RESUMEN

Sembrando el líquido purulento obtenido asépticamente de una artritis de la rodilla, obtuvimos el desarrollo de un *Ascomycete* nuevo al estado de pureza, clasificado como *Pseudallescheria sheari* n. gen. n. sp. y dedicado al Dr. C. L. Shear.

En los medios sólidos de cultivo forma un desarrollo filamentosos veloso o lanoso de un color gris o gris verdoso, tornándose negro con la edad. Reverso: pardusco. En los medios líquidos forma película. Los caracteres micromorfológicos han sido consignados más arriba.

La temperatura óptima del crecimiento vegetativo es de 37° y la de 30° para la formación de los peritecios. Zimograma de la glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa: negativos. Auxanograma de los mismos hidratos de C: todos positivos. Auxanograma del N: positivo para la peptona, asparagina y sulfato de aminio, positivo débil para el nitrato de potasio y negativo para la urea. Coagula y peptoniza la leche. Carece de acción patógena experimental para los animales de laboratorio.

RÉSUMÉ

En ensemençant le liquide purulent prélevé aseptiquement d'une arthrite du genou, nous avons obtenu le développement en culture pure d'un *Ascomycète* nouveau classé comme *Pseudallescheria sheari* n. gen. n. sp. L'espèce est dédiée a C. L. Shear.

Les cultures sur les milieux solides synthétique, ou non, sont

luxuriantes, duveteuses ou laineuses de couleur grise ou grise verdâtre, devennant noire avec l'âge. Revers lisse et brunâtre. Dans les milieux liquide il forme une pellicule.

Les caractères micro-morphologiques ont été décrits dans la page 201.

Température optimale pour le développement végétatif: 37°, pour la formation des perithèces: 30°. Zymogramme: négatif. Auxanogramme des sucres: positif pour le glucose, galactose, maltose, lactose, saccharose et raffinose. Auxanogramme de l'azote: positif pour la peptone, asparagine et le sulfate d'ammonium positif faible pour le NO_3K , et négatif pour l'urée.

Il coagule et peptonise le lait. Nulle action pathogène pour les animaux de laboratoire.

SUMMARY

We have studied a new *Ascomycete* classified as *Pseudallescheria sheari* n. gen. n. sp. obtained in pure culture from a purulent collection of the wright knee of a patient. This species is dedicated to Dr. C. L. Shear.

Its development on solid media is abundant, velvety or cottony, gray or greenish-gray, becoming black in aged cultures. Reverse: smooth and brownish. It forms a pellicle on liquid media.

The micro-morphological characteristics are described on the page 201.

Optimum temperature for vegetative growth: 37° and 30° for the formation of the perithecia. Zymogramme: negative. Carbohydrates auxanogramme: dextrose, galactose, lactose, maltose, sucrose and raffinose, positive.

Nitrogen's auxanogramme: Peptone, asparagine, ammonium sulphate: positive. NO_3K slightly positive; urea negative.

Milk: clotted and peptonized.

Not pathogenic for laboratory animals.

Finalmente queremos expresar nuestro más vivo agradecimiento al profesor Dr. E. Finochietto, en cuyo servicio se ha efectuado la observación clínica y el aislamiento de este hongo, al Dr. H. Hermann, quien ha efectuado el estudio clínico del enfermo y al Dr. G. Basombrio por su gentileza al escribirnos el diagnóstico en latín del género y especie nuevos.

BIBLIOGRAFIA

- CIFERRI, R., y BALDACCI, E. — *Acremoniella (Allescheriella) turchiniana n. sp. isolato da una lesione nodulo gommosa del solco sottomammario. Atti Ist. Bot. e lab. Critt. Un. Pavia*, VII, 1930, pp. 329-339.
- CLEMENTS, F. E., y SHEAR, C. L. — *The genera of Fungi*. New York, The H. W. Wilson Co., 1931.
- CURZI, M. — *Rapports entre les genres Micrascus Zukal et Scopulariopsis Bainier. Soc. Inter. di Microbiol. Boll. Sez. Ital.*, III, 1931, fasc. 9, p. 528.
- DODGE, C. W. — *Medical Mycology*. Saint Louis. The C. V. Mosby Co., 1935.
- EMMONS, C. W., and DODGE, B. O. — *The ascocarpic stage of species of Scopulariopsis. Micologia*, XXIII, 1931, n° 5, pp. 313-331.
- GAUMANN, E. — *Vergleichende Morphologie der Pilze*. 1923.
- JONES, PH. — *A new species Microascus with a Scopulariopsis stage. Mycologia*, vol. XXVIII, 1936, n° 6, pp. 503-509.
- SACCARDO y SYDOW. — *Allescheria in Syll. Fung.*, XIV, 1899, p. 464.
- SHEAR, C. L. — *Life history of an undescribed Ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. Mycologia*, XIV, 1922, n° 5, pp. 239-243.
- TARCHINI, P. — *Micosi ulcero-gommosa della mammella da Allescheriella. Arch. Ital. Dermat. e Sif.*, XIII, 1937, pp. 484-491.
- VAN BEYMA THOE KINGMA, F. H. — *Pseudeurotium zonatum n. g., nov. sp. Zentbl. f. Bakt.*, etc. II Abt., Bd. 96, 1937, pp. 411-416.
- VUILLEMIN, P. — *Sartorya, nouveau genre de Plectascinées angiocarpes. C. R. Acad. Sc.*, CLXXXIV, 1927, pp. 1045.



FIG. 1. — Colonia de *Pseudallescheria sheari* en agar-miel.

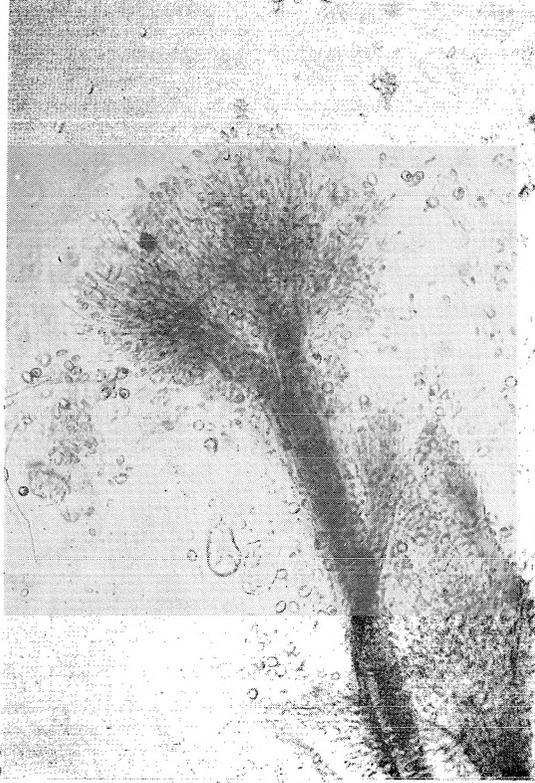


FIG. 2. — Coremios de *P. sheari*.

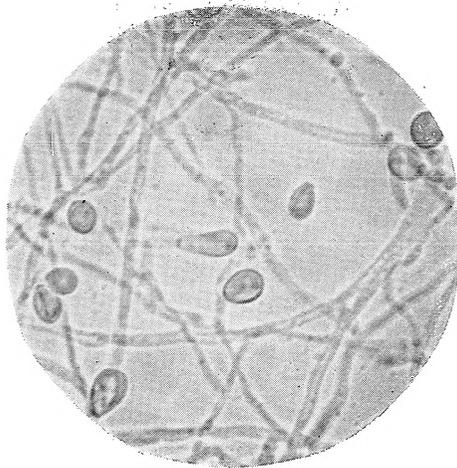
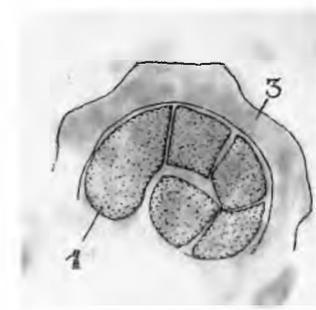
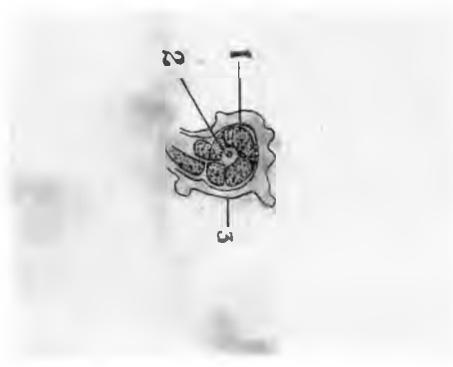
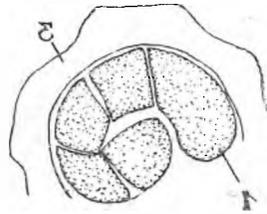
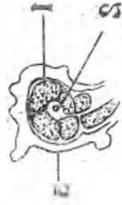
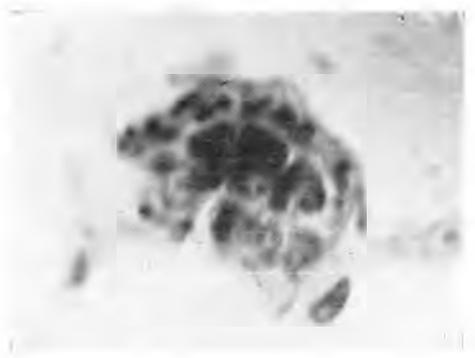


FIG. 3. — Conidias y esporóforos aislados y simples en un cultivo por adhesión.



FIGS. 4 y 5.—Diversos aspectos evolutivos del ascogonio ya tabicado y rodeado de un esbozo de membrana peridial. 1: ascogonio; 2: anticidio; 3: membrana peridial.





FIGS. 4 y 5. — Diversos aspectos evolutivos del ascogonio ya fabricado y rodeado de un esbozo de membrana peridial. 1: ascogonio; 2: anteridio; 3: membrana peridial.



FIG. 6. — Aspecto de un corte de peritecio de *Pseudallescheria shearii*, con ascosporos

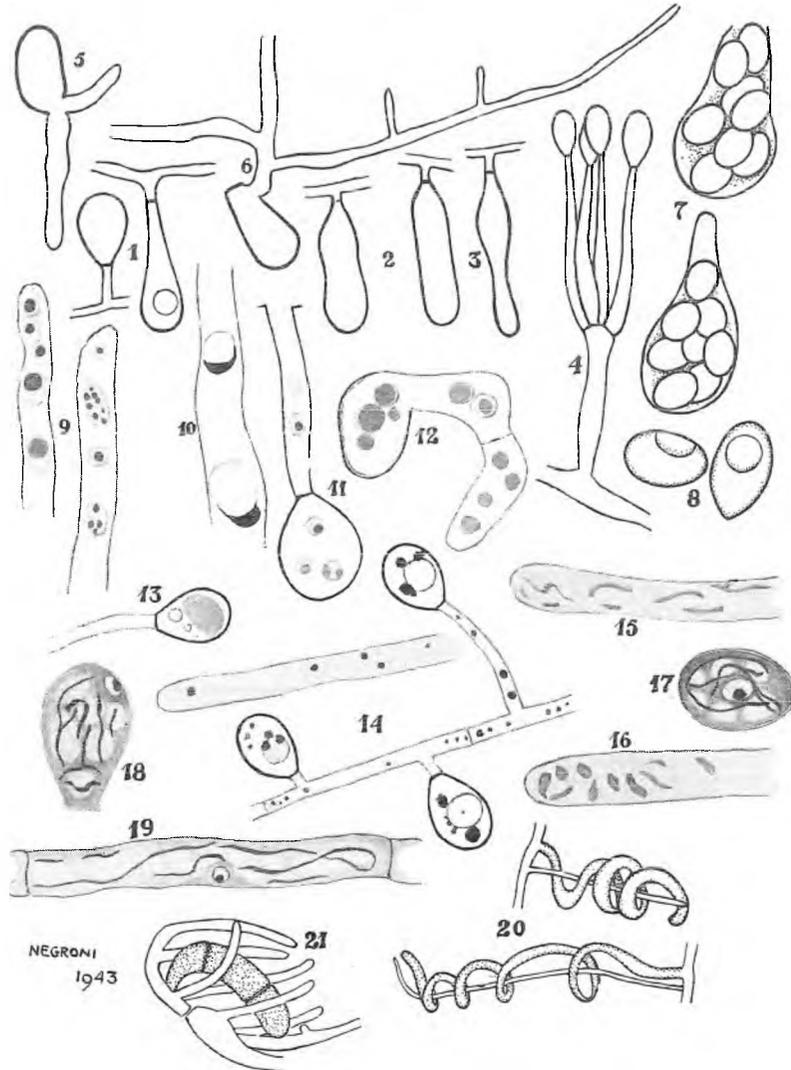


FIG. 7 — Diversos aspectos micromorfológicos de *P. shearii*: 1 a 3: Diversos tipos de conidias. 4, Conidióforo ramificado tipo *Penicillium*. 5 y 6, germinación de los esporos. 7, ascos con 8 ascosporos. 8, ascosporos libres con una depresión hemisférica. 9 a 12, diversos aspectos del vacuoma. 13, glucógeno. 14, grasas. 15 y 16, condrioma en coloración vital. 17, 18 y 19, condrioma y núcleo, en ascosporo, conidia y filamento respectivamente. 20, diversos aspectos del ascogonio arrollado y del anteridio recto. 21, evolución del ascogonio tabicado y comienzo de la formación de la membrana perithecial.