

Recientemente se ha observado el tercer caso humano de adiaspiromicosis en Mérida que se va a publicar en esta misma revista. Puesto que creemos que los resultados de experimentos realizados en Cincinnati con los agentes causales de esta enfermedad pueden interesar al lector de esta revista, los publicamos aquí.

La adiaspiromicosis, causada por dos especies de *Emmonsia*, es una micosis conocida en todo el mundo en numerosas especies de animales, sobre todo en roedores. Ha sido observada recientemente también en el hombre. Doce casos humanos han sido reportados hasta el 1973 incluyendo 2 observaciones de Mérida (Kodousek et al, 1971;⁷) Salfelder et al, 1973)⁽¹⁰⁾.

Estudios experimentales en animales han sido realizados entre 1942 y 1954 por Emmons y Ashburn, 1942⁽³⁾, Ashburn and Emmons, 1945,⁽¹⁾ Carmichael, 1951⁽²⁾ y Menges y Habermann, 1954⁽⁶⁾; recientemente por Slais et al, 1970,⁽¹²⁾ Hejtmánek y Kodousek, 1971⁽⁵⁾, Hejtmánek y Kodousek, 1972,⁽⁹⁾ y Kodousek y Hejtmánek, 1972⁽⁸⁾. Existen

criterios controversiales acerca de la susceptibilidad de especies animales. órganos interesados, tamaño de los organismos en el tejido, reacción tisular, recuperación del agente causal del huésped y multiplicación de organismos en tejidos (Jellison, 1968⁽⁴⁾). Por esta razón una nueva serie de animales ha sido examinada utilizando cultivos e histología en combinación.

ADIASPIRO MICOSIS EXPERIMENTAL EN RATONES Y HAMSTERS

K. Salfelder y J. Schwarz

Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Cincinnati, Laboratorios Clínicos del Jewish Hospital, Cincinnati y Departamento de Patología, Facultad de Medicina, ULA, Hospital Universitario Los Andes, Mérida - Venezuela.

endovenosamente (i.v.) y 55 intraperitonealmente (i. P.); 6 hamsters se inocularon intraperitonealmente y 5 intratesticularmente (i.t.).

Se había planificado observar los resultados en los ratones semanalmente en los primeros meses y después mensualmente, hasta llegar a 6 meses y en los hamsters en intervalos de un mes, hasta 4 meses. Para obtener números iguales en los grupos respectivos, sin embargo, no se pudo sacrificar los animales en los lapsos previstos, puesto que 60 ratones y 1 hamster murieron espontáneamente en intervalos variables. La causa de muerte en estos animales no se debía a la infección fúngica.

Una suspensión de cultivo de 3 cepas de *Emmonsia crescens* (331, 333 y 335) y de una cepa de *Emmonsia parva* (334) se utilizaron en los ratones y de las cepas 333 y 335 en los hamsters. Los cultivos habían sido mantenidos en la modificación de Emmons del agar Sabouraud y los hongos crecidos durante 3 semanas fueron triturados en un mortero y suspendidos en 10 ml de solución salina fisiológica. Se hicieron las inyecciones inmediatamente después de obtener los hongos de los cultivos. Se cultivaron las suspensiones para verificar la viabilidad del inoculum. Se prepararon suspensiones concentradas, pero no se intentó una cuantificación. Cortes de pulmones, hígado, bazo y epiplón de la región hiliar del bazo de todos los animales y adicionalmente de los testículos de los hamsters se examinaron histológicamente después de colorearlos con H&E y el método de Grocott.

Cultivos, solo de los animales

sacrificados, se hicieron de

los pulmones, hígado, bazo y epiplón de todos los animales y de los testículos de los hamsters. Se descartaron los medios después de 6 semanas.

Todas las cepas de *Emmonsia* se había obtenido del Dr. W. L. Jellison. Cepa 333 se aisló de un roedor (muskrat) de Montana; cepa 335 se aisló en Noruega. Cepa 334 es *Emmonsia parva*; se ignora de donde provienen cepa 334 y cepa 331. Cepas 331, 333, 335 son *Emmonsia - crescens*.

RESULTADOS:

Ratones.

No se observaron lesiones macroscópicas en la autopsia.

Como revela la tabla 1,18 animales eran positivos encontrándose organismos en los tejidos y 12 eran positivos en cultivos. Como 2 ratones eran positivos en histología y cultivo, el total de animales positivos era 28.

Después de la inoculación i.v. 11/54 eran positivos en histología y 4/24 en cultivo; después de la inoculación i.p. 7/55 positivos en histología y 8/25 en cultivo.

De las 3 cepas de *E. crescens*, solo una (333) era activa y produjo lesiones histológicas frecuentes, en cambio las dos restantes (331 y 335) eran débiles, produciendo lesiones tisulares solo en un animal de cada grupo. *E. parva* (334) no produjo lesiones tisulares en absoluto. Sin embargo, todas las 4 cepas pudieron ser recultivadas.

Organismos en el tejido eran visibles y cultivos positivos resultaron de una hasta veinticuatro semanas después de la inoculación.

Células fúngicas **en el tejido**

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 109 ratones masculinos y 11 hamsters masculinos; 54 ratones se inocularon

FIGURA 6.

Macrófago con fagosoma cargado de fosfatasa ácida, conteniendo un parásito todavía intacto (a) al lado de otro casi totalmente destruido (b) que muestra una figura mielinoide, Coloración de Gómori. 10.000 X.

FIGURA 7.

Sección de miocardio de rata, inoculada 10 días antes con *T. cruzi*, tratada con suero inmune de rata anti *T. cruzi* y con inmunoglobulinas de conejo anti-rata conjugada con isotiocianato de fluoresceína. Se evidencia reacción específica anti *T. cruzi* en los pseudoquistes.



aparecieron como estructuras quísticas de 20-120 micras de diámetro, fácilmente reconocibles en la coloración de H&E (fot. 1). Con el método de Grocott se reconocen membranas gruesas, Grocott positivas. El interior de los quistes apareció en la coloración de H&E o vacío o con un contenido turbio y espumoso, a veces con estructuras en panal de abejas y discretamente basofílico. Ocasionalmente se observaron gránulos finos, pero jamás se encontraron estructuras Grocott positivas en el contenido.

Además de los organismos de aspecto quístico, se observaron corpúsculos pequeños, sólidos, Grocott positivos, aisladamente o en acumulos, alcanzando 5-8 micras en diámetro (fot. 2). Estos corpúsculos se encontraron en el 50% de todos los casos y predominaron en el bazo. Mientras que las membranas de las células fúngicas de aspecto quístico se tiñeron de color negro con el método de Grocott, los corpúsculos Grocott positivos se colorearon más bien de color marrón oscuro. Muy probablemente no representan células fúngicas de la adiaspiromicosis.

alrededor de las células fúngicas de aspecto quístico había solo una débil reacción tisular (fot. 3). Solo en fases de evolución más tardías se encontraron células gigantes u ocasionalmente granulomas pequeños. Necrosis no se observó.

Después de la inoculación endovenosa había frecuentemente lesiones en varios órganos simultáneamente (tabla 2). Células fúngicas se observaron más frecuentemente en cortés del hígado y bazo que en aquellos de los pulmones, mientras que

se recuperaron por cultivo de los pulmones tan frecuentemente como de los hígados y bazos en conjunto.

Después de la inoculación intraperitoneal se observó diseminación hacia hígado y bazo; frecuentemente se obtuvo recultivo del bazo.

Hamsters

Igual como en los ratones no se observaron lesiones macroscópicas.

En 5 de los 11 animales se encontraron organismos en el tejido; recultivo se logró en 2 de los histológicamente positivos (tabla 3). No había diferencia entre la positividad de los hamsters inoculados por vía intraperitoneal e intratesticular. La cepa 333 era definitivamente más agresiva que la 335. Los organismos se observaron en el tejido y fueron recultivados 5 hasta 21 semanas después de la inoculación.

La morfología de los organismos en el tejido de hamsters era similar a la de los ratones (fot. 4 y 5), con excepción de las células fúngicas en el testículo de un hamster cinco semanas después de la inoculación. En este animal se encontraron estructuras parecidas a exoesporas o tal vez al fenómeno de Hoeppli-Splendore (fot. 6).

Existía una marcada tendencia a formar granulomas (fot. 7 y 8), particularmente en los testículos, comenzando 5 semanas después de la inoculación. La diseminación después de la inoculación intratesticular tuvo lugar hacia el hígado y después de la inoculación intraperitoneal hacia el bazo.

COMENTARIOS:

Se logró fácilmente la infección de ratones y hamsters cori especies de *Emmonsia*, a pesar de los reportes acerca de la resistencia del hamster en contra de estos agentes causales (Ashburn y Emmons, 1945)⁽¹⁾. Formación de granulomas era más prominente en los hamsters.

En contraposición a los hallazgos de Hejtmánek y Kodousek, 1972⁽⁶⁾ no se produjeron lesiones microscópicamente visibles en nuestros experimentos. El número de organismos en el tejido era bajo en los ratones y no fueron encontrados histológicamente en los casos en los cuales fueron recuperados en cultivos.

Una de nuestras cepas de ***Emmonsia crescens*** (333) era definitivamente más activa en ratones y hamsters. Puesto que en los ratones inoculados con la cepa de ***Emmonsia parva*** células fúngicas de aspecto quísticos no fueron encontradas en el tejido, no fue posible comparar el tamaño de las células quísticas de las dos cepas de ***Emmonsia*** en el tejido.

Diseminación después de la inoculación en animales no había sido lograda hasta 1951

(Carmichael)⁽²⁾; sin embargo, ha sido comprobada por varios investigadores más tarde y se observó también en nuestra serie. En relación con este particular, la incidencia alta del compromiso del bazo por histología y cultivos parece notoria, porque este órgano según las referencias bibliográficas ha sido sede de lesiones fúngicas solo ocasionalmente (Hejtmánek y Kodousek, 1972).⁽⁶⁾ Si existe multiplicación de las células fúngicas en el tejido hu-

mano y en animales y como se efectúa, es uno de los puntos problemáticos y controversiales en la adiaspiromicosis. La multiplicación en el tejido no ha sido comprobada sin lugar a dudas hasta ahora, lo que incluye los resultados de nuestra serie. Hasta 1951 se creía que *Emmonsia* no se reproduce en el huésped (Carmichael) (2). Los hallazgos que lo contradicen son partículas internas dentro de las células quísticas observadas en un caso humano, las cuales fueron consideradas sugestivas de endoesporas (Kodousek et al, 1971) (7). En el tejido de animales se observaron también corpúsculos internos, endoesférulas y material granular, Grocott positivo, dentro de las células quísticas como también estructuras que fueron interpretadas como exoesporulación. Estas formaciones fueron observadas saliendo de células fúngicas quísticas, varias horas después de la muerte (Slais et al, 1970 (12); Kodousek y Hejtmánek, 1972). (8).

14

En las células quísticas de nuestra serie se reconocieron claramente la típica membrana gruesa con varias capas y material de aspecto de panal de abejas en el contenido como fue descrito por Kodousek et al,

1971) (7). Sin embargo, no pudieron detectarse endoesporas Grocott positivas. Estructuras Grocott positivas parecidas a exoesporas fueron vistas solo en uno de nuestros casos, pero dudamos que estas estructuras sean signos seguros de multiplicación, puesto que no se vieron en otros casos y porque pueden representar prominencias de las varias capas que forman la membrana.

Gemación de organismos pe

queños, parecidos a células levaduriformes, ha sido observada en frotis de tejidos (Hejtmánek y Kodousek, 1971) (5) 4

a 12 días después de la inoculación, pero no fue posible encontrar estructuras parecidas en cortes tisulares de nuestra serie. Los corpúsculos pequeños, Grocott positivos, vistos especialmente en el bazo de nuestros animales, no demostraron características bien típicas para poder considerarlos como células fúngicas. Además, los mismos corpúsculos han sido observados también en otra serie experimental con Basidiomycetes (Salfelder y Schwarz

1975) (11), de tal manera que aparentemente representan corpúsculos tisulares hasta ahora no definidos y clasificados.

Nuestras observaciones, por consiguiente, permiten solo la interpretación que las células fúngicas inoculadas crecen rápidamente, forman estructuras quísticas en el tejido y no producen formas intermediarias. Las células fúngicas quedan viables en el tejido hasta 6 meses; viabilidad hasta varios meses ha sido reportada antes (Emmons y Ashburn, 1942) (3), pero sin signos de multiplicación en el tejido.

A pesar de la frecuencia relativamente baja, con la cual pudieron ser recuperados los hongos por cultivos, de tejidos que los contienen, se recomienda intentar a cultivar *Emmonsia* del tejido en casos humanos.

RESUMEN

Después de inocular cepas de *Emmonsia crescens* por diferentes rutas a ratones y hamsters se observaron células fúngicas quísticas grandes en los tejidos de estos animales.

Después de la inoculación se encontró también diseminación hallándose (os organismos más frecuentemente en el bazo. En cambio, las células fúngicas se encuentran en la enfermedad espontánea del hombre y de los animales solo en los pulmones. Una cepa de *Emmonsia parva* no produjo organismos grandes quísticos en el tejido.

No fueron halladas formas intermediarias de células fúngicas previo a la formación de quistes; tampoco pudo comprobarse multiplicación de células fúngicas a partir de los quistes.

Puesto que se logró aislar mediante cultivos 2 cepas de *Emmonsia* de los tejidos hasta 6 meses después de la inoculación, se sugiere intentar cultivar material tisular humano para poder establecer el diagnóstico clínico.

ZUSAMMENFASSUNG

Kultursuspensionen von drei *Emmonsia crescens* und einem *Emmonsia parva* Stamm, inokuliert in Mause und Hamster, erzeugten Gewebsveränderungen mit grossen zystenähnlichen Organismen, die leicht in der H&E Färbung erkannt werden konnten. *Emmonsia parva* erzeugte keine erkennbaren Organismen im Gewebe.

Ein Ueberraschungsbefund war das häufige Vorkommen von Pilzzellen in der Milz, während Adiaspiromykose in Mensch und Tier nur in der Lunge bekannt ist.

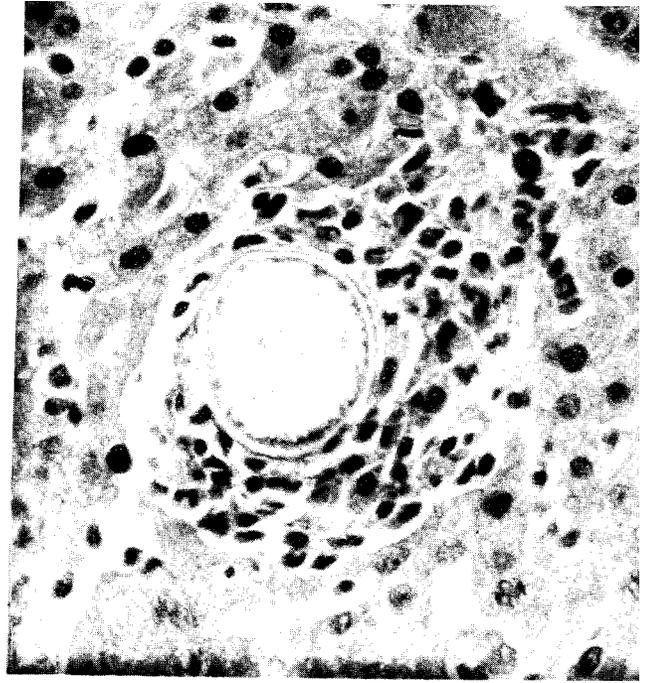
Uebergangsformen von inokulierten Pilzzellen zu grossen zystischen Zellen konnten nicht gefunden werden; ebenfalls war die Suche nach Zeichen von Multiplikation zystischer Pilzzellen im Gewebe negativ.

Da bis 6 Monate nach der Inokulation die Pilze aus dem Gewebe gezuechtet werden konnten, sind Zuechtungsversuche aus menschlichen Gewebe fuer diagnostische Zwecke angezeigt.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashburn, L.L. & Emmons, D. W.: Experimental Haplosporangium infection Archives of Pathology, 39: 38, (1945).

Carmichael, J. W.: The pulmonary fungus **Haplosporangium parvum** II. Strain and generic relationships. Mycologia, 43: 605624, (1951).
3. Emmons, C.W. & Ashburn, L.L. The isolation of Haplosporangium parvum N. sp. and Coccidioides immitis from wild rodentes. The relationship to Coccidioidomycosis. Public Health Reports, 57: 1715-1727, (1942).
4. Jellison. W. L.: Adiaspiromycosis. Mountain Press Publishers, Missoula, Montana. (1969).
5. Hejtmánek. M. & Kod'ousek, R.: Zur Vermehrung von Emmonsia crescens in vitro und in vivo. Mykosen, **14**: 269-274, (1971).
6. Hejtmánek, M. & Kod'ousek, R.: Morphologie der Adiaspiromykose im Versuch an genetischen Maeusestaemmen. Mykosen, 15: 249-253, (1972).
7. Kod'ousek, R., Vortel, V., Fingerland, O., Voljtek, A., Sery, Z., Hájek, V. & Kucera, K.: Pulmonary Adiaspiromycosis in man caused by Emmonsia crescens: Report of a unique case. American Journal of Clinical Pathology, 56: 394-399, (1971).
9. Kod'ousek, R. Hejtmánek, M.: Some morphological observations concerning problems of endosporula tion in Emmonsia crescens aetiological agent in adiaspiromycosis. Mycopathologia et Mycologia applicata, 47: 343-348, (1972).
9. Menges, R. W. & Habermann, R. T.: Isolation of Haplosporangium parvum from soil and results of experimental inoculation. American Journal of Hygiene, 60: 106-116, (1954).
10. Salfelder, K., Fingerland, A., Mendelovici, M. de, & Zambrano, P.Z.: Two cases of Adiaspiromycosis. Beitrage zur Pathologie, 148 94-100, (1973).
11. Salfelder, K. & Schwarz, J.: Inoculation of Basidiomycetes into hamsters and mice. Mykosen. (aceptado para publicación) (1976)
12. Slais, J., Hamáček, F. & Sterba, J.: Internal bodies of adiaspores of Emmonsia crescens in the lungs of mice. Folia Parasitologica (Praha), 17: 319-322, (1970).



Fot. 3. Adiaspora de *E. Crescens* en el hígado de ratón. Reacción histiocitaria nodular, incipiente. (D-7811). Col. H&E; x 600.



Fot. 4. Adiaspora grande de *Emmonsia crescens*. Membrana celular gruesa con varias capas y citoplasma granular. (D-7869); hamster, hígado. Col. H&E; x 600.

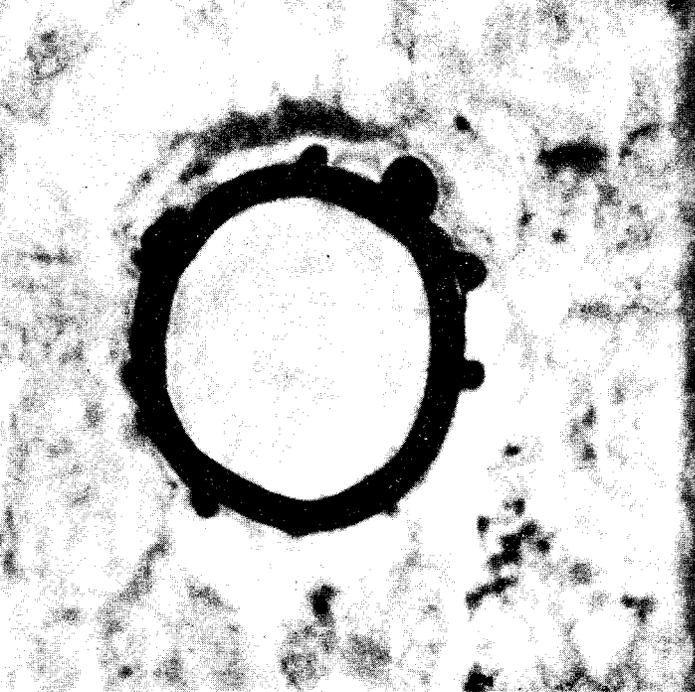
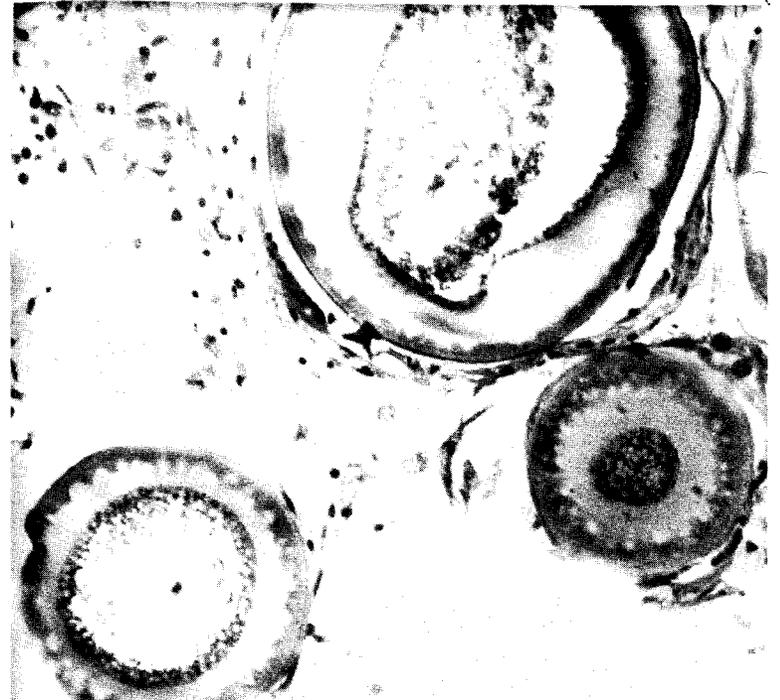
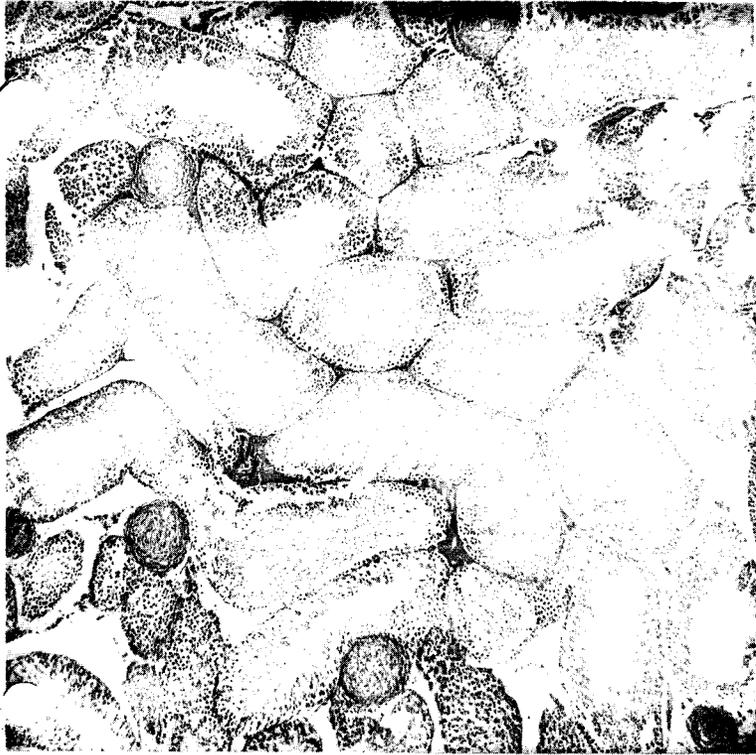


Fig. 6 Adiaspora de *E. crescens* con prominencias parecidas a gemas. La célula -aparte de su tamaño- parece bastante a una levadura de *Paracoccidioides brasiliensis*. Sin embargo, en la coloración de H&E los contornos de esta célula grande no están precisos. Debe tomarse

en consideración la posibilidad de que se trate de una reacción de antígeno-anticuerpo (fenómeno de Hoeppli-Splendore) simulando "exoesporas" o gemación múltiple. (D-7847); hamster; testículo. Col. Método de Grocott; x 1250.



Fot. 5. Tamaño variable de adiasporas y del grosor y de la estructura de sus membranas. *E. crescens*. (D-7915); hamster, testículo. Col. H&E; x 230.



Fot. 7 Granulomas epitelioides múltiples en el intersticio del testículo; algunos con adiaesporas de *E. crescens* en el centro. (D-7847) ; hamster, inyección intratesticular. Col. H&E; x 45.



Fot. 8. Granuloma epitelioides en el intersticio del testículo. El mismo animal como en fot. 7. Col. H&E; x 310.

Tabla 2. Órganos Positivos en Histología y Cultivos en Ratones

Ruta	Histología	Total	Cultivos	Total	
í.p.	Epiplón Hígado y bazo	6 1	7/5	Epiplón Bazo	2 8/25
í.v.	Bazo, Hígado, Pulmón	4	11/54	Bazo	4/24
	Bazo, Hígado	5			
	Bazo, Pulmón	1			
	Pulmón	1			
	Total	10			
	Bazo	9	Hígado	2	
	Pulmón	6	Pulmón		

Tabla 3. Resultados de Histología y Cultivos **en** Hamsters

Cepas	3	5	11	15	19	21 Semanas	Total,
Rutas							
333	i. P.	+	-	+			2/3
	intra test.	+			0 (+ hígado)		2/2 4/5
335	i.p.					+	1/3
	intra test.					(+ bazo)	1/3 1/6
Total	0/12		40/21		2/2		5/11 1/1

+ = Histología positiva -

- = Histología negativa 9

0 = Cultivo positivo * = *

= **Muerte espontánea**