

CROMOMICOSIS NATURAL EN EL *BUFO MARINUS*

Por L.F. Velásquez (1) y
A. Restrepo (2)

RESUMEN

En un estudio realizado en 75 sapos (*Bufo marinus*) se encontró que dos especímenes estaban infectados por mohos negros. Los animales presentaban lesiones granulomatosas en varias vísceras, en las que fue posible observar células esclerosas, idénticas a las halladas en la cromomicosis humana. Los cultivos de tales lesiones permitieron aislar dos mohos negros, de crecimiento lento, incapaces de crecer a 36°C y, además, desprovistos de capacidades hidrolíticas. No fue posible hacer que las cepas Bufo 3 y Bufo 5 esporularan. Los resultados del estudio son analizados comparativamente con otros informes sobre infecciones por mohos negros en anfibios.

INTRODUCCION

En 1910 Carini describió una infección granulomatosa y generalizada en la rana brasileña *Leptodactylus pentadactylus*, y en las lesiones observó unos esporos café similares a los encontrados en cromomicosis.

Almeida (1934) confirmó los hallazgos de Carini y reprodujo la enfermedad inoculando ranas sanas. En los animales estudiados se encontraron las lesiones en las vísceras, permaneciendo la piel y el tejido subcutáneo sin ninguna alteración. Ninguno de los primeros investigadores logró cultivar el agente causante.

En 1960, Elkan describe la presencia de lesiones granulomatosas en sapos ingleses (*Bufo bufo*). Los granulomas estaban presentes en la piel, tejido subcutáneo y órganos internos. En los cortes de tejido se observaron estructuras similares a hifas de color café. Dhalival y Griffiths (1963-1964) observaron nódulos tumorales en la piel, pared abdominal y órganos internos de ranas de Malaya (*Bufo melanostictus*). Los tumores eran granulomas que contenían hifas septadas de

color café oscuro. Estos dos últimos autores no describieron las típicas células escleróticas de la cromomicosis.

Correa, y Col. (1968) describieron en sapos colombianos (*Bufo sp.*) lesiones similares a las de la cromomicosis. Aunque se aislaron mohos negros, su relación exacta con los procesos patológicos no fue determinada claramente. Frank y Roester (1970) describen en Alemania la presencia de granulomas internos que contenían células como las de cromomicosis en el *Bufo alvarius*. Se informó que *Hormiscium dermatitidis* era el hongo causante de las lesiones; pero los autores no describen en su trabajo los criterios usados para la clasificación de los hongos. Dei-Cas y Mañe Garzón (1971) encontraron en Uruguay un espécimen de *Bufo paracnemis* con lesiones granulares en pulmón que contenía células escleróticas y micelio café.

Elkan y Philpot (1973) estudiaron especies de ranas enviadas desde Estados Unidos a Londres. Los animales presentaban lesiones externas e internas así como también tubérculos. Al examen microscópico, los tejidos revelaron "clami-

(1) Profesor de Microbiología Depto. de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Profesora de Micología Depto. de Parasitología y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

dosporos" café oscuros e hifas septadas. Recientemente se ha informado la infección por mohos negros de *B. marinus* (Cicmanec, Ringler y Beneke, 1973). Nueve de los quince sapos enfermos presentaban lesiones internas con células del hongo. Se logró aislar en cultivo el *Phialophora pedrosoi*.

Es un hecho que en muchas partes del mundo las ranas y los sapos pueden ser infectados por hongos dematiáceos y desarrollar una enfermedad casi igual o idéntica a la cromomycosis humana.

Este informe presenta los resultados del estudio y comparación de los mohos negros aislados de sapos con los agentes causantes de la cromomycosis humana, contribuyendo así al conocimiento de las relaciones ecológicas de los mohos negros y el papel de tales organismos en la naturaleza. En este artículo no se informa de la comparación inmunológica que se realizó.

MATERIALES Y METODOS

Un total de 75 sapos (*Bufo marinus*) obtenidos de las zonas rurales de los municipios de Copacabana y el Peñol, fueron sacrificados. La piel y los órganos internos fueron separados asépticamente y cada uno de los órganos fue dividido en dos partes. Una parte se usó para exámenes directos con KOH y para cortes histopatológicos. La segunda parte fue cultivada en dos cajas de Petri con Agar extracto de levadura adicionado con antibióticos y cicloheximida tal como lo describió Smith (1964). Estas cajas se incubaron a 22-24 C. por cuatro semanas. Para evitar confusiones con los mohos negros contaminantes del aire, se inocularon las cajas con el macerado de los tejidos, en la parte central y en el sentido de las manecillas del reloj. Solamente fueron estudiadas las colonias que aparecían en las manchas del inóculo.

Se estudiaron cinco mohos negros en total: dos aislados de sapos y tres de pacientes con cromomycosis. Los últimos clasificados como *Phialophora* (*Fonsecae*, *Hormodendrum*) *pedrosoi*, (cepa B R de nuestra colección) *Phialophora verrucosa* (cepa No. C-62A de la colección de la Universidad de Tulane) y *Cladosporium carrioni* (cepa No. AI de la colección de la Universidad de Tulane). Todos los cultivos se mantuvieron en Agar Sabouraud dextrosa, a temperatura ambiente y con transferencias mensuales.

La esporulación fue estudiada en diferentes medios sólidos como, zémola de maíz, Sabouraud dextrosa, infusión de papa, Mycosel y Czapek Dox. (Difco Laboratories Detroit, Michigan). Los microcultivos se guardaron a temperatura ambiente y a 17°C por un mes con revisiones periódicas. Se estudió también la capacidad de crecimiento a varias temperaturas y la de hidrolizar proteínas.

En estos estudios se incluyeron cepas de un moho negro contaminante del aire como control. Para determinar la tolerancia a la temperatura se colocaron cepas en incubadoras a 17,24,36,37 y 39°C. Cada cepa era colocada en cinco tubos con Agar Sabouraud dextrosa e incubados por un mes. Todas las incubadoras tenían un recipiente con suficiente agua para asegurar una humedad apropiada. Para el estudio de la actividad hidrolítica se usaron como substratos caseína y gelatina, de acuerdo a los trabajos realizados por Silva (1960).

Los experimentos se hicieron por duplicado.

RESULTADOS

De los 75 animales sacrificados había dos con lesiones macroscópicas internas, y en ningún caso la piel estaba alterada. Los sapos No. 20 y 54 presentaban numerosos nódulos en el hígado, y el segundo animal tenía también lesiones en el riñón. Los nódulos variaban en tamaño (3-8mm), sobresalían por encima de la superficie de los órganos y eran de un color amarillo crema. El riñón afectado había sido reemplazado parcialmente por la formación nodular. Microscópicamente, estas lesiones revelaban abundantes células café de un hongo, similares a las células escleróticas descritas por Meddler (1915) en cromomycosis humana. (Fig.1). No se observaron fragmentos de hifas, aunque unas pocas células escleróticas mostraban tendencias a elongarse. El informe histológico de uno de los tejidos decía así: "Riñón, (*Bufo* sp): Formación de nódulos bien delimitados, formados por células epiteliales. Se observaron células gigantes multinucleadas, y leucocitos. Se encontraron esporos septados café dentro de las células gigantes y en el centro del granuloma. Diagnóstico: Cromomycosis" (Figuras 2, 3).

Las cajas de Petri inoculadas con los nódulos del hígado del sapo No. 20 y con los del hígado y riñón del sapo No. 54 dieron colonias visibles al cabo de 20 días.

Estas colonias eran puntiformes y de un color negro grisáceo; al cabo de 30 días tenían un diámetro de 10.20 mm y presentaban micelio aéreo aterciopelado (Fig.4). Las cajas de Petri inoculadas con hígado del sapo No.54 se contaminaron y los micelios de crecimiento lento se perdieron. Los dos aislamientos que quedaron se denominaron *Bufo* 3 (Sapo No. 20, hígado) y *Bufo* 5 (Sapo No.54, riñón). No se encontraron formas de esporulación en ninguno de los microcultivos realizados con las cepas de *Bufo* 3 y *Bufo* 5. El examen microscópico de las colonias y la observación de los microcultivos revelaron solamente un micelio aéreo con hifas septadas de color café. Al mismo tiempo se encontraron algunas hifas espiraladas, (Fig.5). La clasificación de estos mohos aislados aún está pendiente.*

* En vista de la dificultad que se tuvo para clasificar los hongos aislados, se enviaron cultivos para su estudio los siguientes micólogos: doctores D. Borrelli, Caracas; M.Gordon, Albany, N.J.; B.H.Cooper Philadelphia, Pa., y P.Stockdahn, London. Estos estudios no han dado aún resultados positivos.

En lo que concierne a las pruebas fisiológicas, los estudios de termotolerancia revelaron que las cepas de *Bufo 3* y *Bufo 5* eran capaces de crecer a 17 y 24°C pero no a 36°C o temperaturas superiores. Estos mismos resultados se obtuvieron con el *Cladosporium sp.* hongo usado como control. Las cepas humanas de *C. carrioni* y *P. verrucosa* crecieron bien en todas las temperaturas con excepción de 39°C; *P. pedrosoi* creció, también a 39°C (Tabla 1). Aunque la colonia presentó un tamaño más reducido que a las temperaturas experimentales más bajas. La hidrólisis de la gelatina y la caseína fue positiva solamente con la cepa *Cladosporium sp.* Las cepas aisladas de sapos y humanos no hidrolizaron estos substratos.

DISCUSION

Una vez más, las observaciones originales de Carini de que los anfibios anuros presentaban granulomas con células escleróticas se confirma en el presente estudio. La reacción histológica debida a la presencia de las células del hongo es intensa y acompañada por una alteración marcada del tejido. En casos como el del sapo No. 34 existen tantas lesiones en los órganos afectados que su normal funcionamiento tiene que ser alterado.

La presencia de lesiones simultáneas en varios órganos, por ejemplo el hígado y riñón, indican que ha ocurrido una verdadera diseminación hematogena. Por lo tanto, se está en presencia de una enfermedad sistémica, que al juzgar por la apariencia microscópica del hongo en los tejidos, podría también llamarse cromomicosis.

No se ha determinado aún si los casos de anfibios informados corresponden a cromomicosis. Las células escleróticas han sido observadas por Carini (1910), Almeida (1934), Correa y col. (1968), Frank y Roester (1970), Dei-Cas y Mañe-Garzón (1972), Cicmanec d y col (1973) y Elkan y Philpot (1973). Los últimos autores no describen las células escleróticas como tales pero dos de sus ilustraciones (fig. 5 y 7) dejan poca duda de que los "clamidosporos" observados y las "células del hongo" eran, en efecto, células de Meddlar. Estos autores indican que hay predominancia de elementos miceliarios en los tejidos afectados. Tales elementos también han sido descritos en cromomicosis humana, pero para efectos de establecer un diagnóstico, deben estar presentes las células escleróticas en los tejidos. (Al-Doory, 1972).

La localización de las lesiones en animales naturalmente infectados es también de interés. Aunque todos los informes han mencionado que los anfibios estudiados poseían lesiones internas, se han descrito también lesiones externas por Dhalival y Griffiths (1963-64), Elkan (1960), Elkan y Philpot (1973).

Aunque estos investigadores postularon que las lesiones en piel y tejido subcutáneo se presentan primero y las de los órganos internos después bien puede ser lo contrario. Si los desórdenes informados por ellos son idénticos a aquellos

observados en animales afectados sólo internamente podría pensarse en la diseminación a partir de una lesión primaria profunda, dando lugar a la formación de lesiones externas.

Como se carece de estudios en el hábitat natural de estos hongos, todas estas consideraciones permanecen en el campo de la especulación. Es mucho lo que hay por explorar en este campo.

Montemayor (1949) y Silva (1960) utilizaron pruebas fisiológicas con el objeto de diferenciar mohos negros saprofitos y patógenos. La tolerancia a la temperatura y a la habilidad para hidrolizar ciertos substratos, son pruebas que han permitido demostrar que casi todos los hongos aislados de casos humanos han sido capaces de crecer a temperaturas por encima de 30°C pero incapaces de hidrolizar la caseína y la gelatina. Si utilizamos estos criterios podríamos afirmar que los hongos aislados del *Bufo 3* y del *Bufo 5* son "saprofitos" debido a su inhabilidad para crecer por encima de 30°C, pero "patógenos" a causa de su carencia de enzimas hidrolíticas.

Teniendo en consideración que estos son hongos aislados de sapos, no podemos esperar que cumplan con la característica de termotolerancia debido a que los anfibios son animales heterotermos y los sapos, en particular, no resisten altas temperaturas. A pesar de no ser termotolerantes creemos que los hongos estudiados son patógenos. Otro ejemplo de un hongo no termotolerante pero patógeno es el denominado *Aureobasidium (Exophiala) salmonis* aislado de truchas por Carmichael (1966) y estudiado por Borrelli (1969). La máxima temperatura de crecimiento para este hongo fue de 28°C, y como en el caso nuestro, no hidrolizó la gelatina. El potencial patógeno de varios de los hongos encontrados en anfibios ha sido comprobado por la inoculación de tejidos enfermos en anfibios sanos, los cuales desarrollaron la enfermedad (Almeida, 1934; Dhalival y Griffiths, 1964; Cicmanec d y col. 1973).

Los aislamientos que se obtuvieron en los cultivos y que fueron usados para la inoculación de animales sanos demostraron que eran patógenos, según los trabajos de Dhalival y Griffiths (1963-64) y los de Cicmanec d y col. (1973). Ensayos similares no resultaron en el caso de Elkan y Philpot (1973). Es un hecho desafortunado que todos los ensayos que se hicieron para inducir esporulación en nuestros hongos aislados de sapos hubieran fallado, sin permitirnos por lo tanto hacer su clasificación.

Es de gran interés el hecho de que casi todos los informes de anfibios afectados por mohos negros, indican que los autores tuvieron dificultades en clasificar estos hongos aislados. Elkan (1960) falló en las experiencias para inducir esporulación en los hongos aislados de *Bufo*; Dhalival y Griffiths (1964) fueron incapaces de observar cualquier tipo de esporulación en los cultivos obtenido de *B. melanostictus*; Correa y col. (1968) comentan que ocho de los hongos aislados de *Bufo sp* no fueron clasificados debido a la carencia de esporulación.

Sería de gran interés reunir todos los hongos aislados de anfibios y realizar un estudio comparativo. Quizás un estudio más refinado de la pared celular de las hifas, similar al realizado por Szanislo, Cooper y Voger (1972) para el estudio de los agentes de la cromomycosis humana, permitiría una identificación apropiada de estos mohos negros difíciles de hacer esporular en cultivos.

Alberto Correa y Carlos Jaramillo con el material fotográfico y la asistencia técnica de la señorita Amelia Jiménez.

TABLA No.1

Crecimiento a varias temperaturas de la cepas de Bufo 3 y Bufo 5, *P. pedrosoi*, *P. verrucosa* y *C. carrioni*.

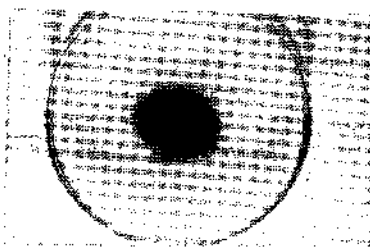
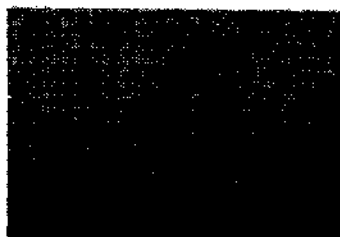
AGRADECIMIENTOS

Expresamos los más sinceros agradecimientos a las siguientes personas por su gran cooperación en el estudio de nuestras cepas: Doctores Dante Borelli, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas; Morris A. Gordon, State of New York, Department of Health, Albany, New York; Bill H. Cooper, Department of Microbiology, Temple University, Philadelphia, Pa. y Phillis M. Stockdale, The Commonwealth Micological Institute Surrey, Encland.

Cepa	Temperatura (°C) (°)				
	17	14	36	37	39
<i>Bufo 3</i>	+	+	-	-	-
<i>Bufo 5</i>	+	+	-	-	-
<i>P. pedrosoi</i>	+	+	+	+	+
<i>P. verrucosa</i>	+	+	+	+	-
<i>C. carrioni</i>	+	+	+	+	-
<i>Hormodendrum sp</i>	+	+	+	+	-

Agradecemos también al doctor Mario Robledo por el estudio de los cortes de tejido, la cooperación de los doctores

(°) Crecimiento durante 30 días de incubación. Las pruebas se hicieron por duplicado.



- Fig. No. 1 Examen directo (KOH) de un nódulo en hígado de sapo. Observe las células escleróticas (65x).
- Fig. No. 2 Corte de hígado (Sapo No. 54). Observe el granuloma HE (10x).
- Fig. No. 3 Corte de hígado (Sapo No. 54). Observe células escleróticas dentro de células gigantes. HE (40x).
- Fig. No. 4 Cultivo hecho con parte del granuloma del riñón de *Bufo Marinus*, con incubación a temperatura ambiente. Se observa una colonia negra de micelio corto y textura aterciopelada.
- Fig. No. 5 Examen directo de los cultivos de los granulomas encontrados en órganos de *Bufo marinus*. Observe hifas tabicadas en pared lisa y gruesa.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Doory, J. *Chromomycosis*. Mountain Press Publishing Col, Missoula, Montana, 1972.
- Almeida, P.F. "Consideracoes em torno de un cogumelo encontrado por Carini no pumao de Sapo (*Leptodactylus "pentadactylus"*). *Revista de Biología e Higiene* 5: 51-55, 1934.
- Biguet, J.; Fruit, J.; Andrieu, S. & Tran Van Ky. "Structure antigénique et systématique des espaces du genere *Aspergillus*". *Bulletin Société Français de Mycologie. Medicale* 2: 273-284, 1969.
- Borelli, D. "Cromomycosis profunda visceral". *Medicina Cutánea* 6: 583-594, 1969.
- Busey, J.E. & P.F. Hinton. "Precipitins in blastomycosis. *American Review Respiratory Diseases*" 92: 637-639, 1965.
- Carini, A. "Sur une moisissure que cause une meladie spontanée de *Leptodactylus pentadactylus*". *Annales de l'Institute Pasteur*. 24:157-160, 1910.
- Carmichael, J.W. "Cerebral mycetoma of trout fue to a *Phialophora*- like fungus". *Sabouraudia*. 120-123, 1966.
- Cimamed, J.L.; D.H. Ringler & E.S., Beneke. Spontaneous occurrence and experimental transmission of the fungus, *P. pedrosoi* in the marine toad, *B. marinus*. " *Laboratory Animal Science* 23: 43-47, 1973.
- Conant, N.F. & D.S. Martín "The morphologic and serology relationships of the various fungi causind dermatitis verrucosa (Chromoblastomycosis)". *American Journal Tropical Medicine*. 17: 553-578, 1937.
- Correa, R.; Correa, J.; Carcés G.; Méndez, D.; Morales, L.F. & A. Restrepo "Lesiones micóticas (cromomycosis?) observadas en los sapos (*Bufo* sp). *Antioquia Médica* 18: 175-184, 1968.
- Dhalival, S.S. & D.A. Griffiths. "Fungal disease in Malayan toads: and acute lethal inflamatory reaction". *Nature* 197 (4866): 467-469, 1963.
- Dhalival, S.S. & D.A. Griffiths. Fungal disease of Malayan toads (*Bufo melanostictus*). *Sabouraudia* 3: 279-287, 1964.
- Dei-Cas, E. & F. Mañe-Garzón. "Cromoblastomycosis espontánea en un anfibio del Uruguay." *Revista Uruguaya de Patología Clínica y Microbiológica* 9: 12-23, 1971.
- Elkan, E. "Some interesting taphological cases in amphibians. *Proceedings of the zoological Society of London*. 134: 274-296, 1960.
- Elkan, E. & C.M. Philpot. "Mycotic infections in frogs due to a *Phialophora*- like fungus. *Sabouraudia* 11: 99-105, 1973.
- Frank, W & U. Roester. "Amphibian als trager von *Hormiscium (Hormodendrum) dermatitis* (Kano, 1937) einen Erreger der Chromoblastomy kose (Chromomykose) desenschen". *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 21: 93-108, 1970.
- Medlar, E.M. "A cutaneous infections caused by a new fungus: *P. verrucosa*, with a study of the fungus." *Journal of Medical Research* 32: 507-522, 1915.
- Montemayor, L. "Estudio de las propiedades biológicas de varias cepas de hongos patógenos causantes de la cromomycosis y de especies vecinas saprofitas y patógenas". *Micopathología et Micología Aplicada*. 4: 379 303, 1949.
- Silva, M "Growth characteristics of the fungi of chromoblastomycosis". *Annals of the New York Academy of Sciences* 89: 17-29, 1960.
- Smith, C.D. "EVIDence for the presence in yeast extract of substances whith stimulate the growth of *H. capsulatum* and *B. Dermatitidis* similarly to that found in starting manure extract". *Mycopatologie er Micología Aplicada* 22: 99-105, 1964.
- Szanizlo, P.J.; Cooper, B.H. & H.S. Voges. "Chemical compositions of the hyphal walls od 3 chromomycosis agents. *Sabouraudia* 10: 94-102, 1972.