

AISLAMIENTO DE HISTOPLASMA CAPSULATUM DEL SUELO DE UNA CUEVA EN EL PERU

ALFRED S. LAZARUS Y LIBERO AJELLO

Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública de Lima; y Mycology Unit,
Communicable Disease Center Laboratory Branch, Chamblee, Georgia.

INTRODUCCION

Hasta la última década, no se había reconocido la amplia distribución de *Histoplasma capsulatum*. En 1944 dicho organismo aún no había sido identificado en la naturaleza y, por todos los datos que se podían conseguir, se pensaba que la histoplasmosis en el hombre era siempre fatal (Conant y col., 1944).

Sin embargo debido a las investigaciones de CHRISTIE y PETERSEN (1945), a partir de 1945 se considera la histoplasmosis como una enfermedad frecuente y un tanto benigna. Estos autores, correlacionando calcificaciones pulmonares observadas en el hombre con reacciones negativas a la tuberculina y positivas a la histoplasmina, verificaron la prevalencia de una forma benigna y asintomática de histoplasmosis en el área de las cuencas de los ríos Mississippi y Ohio, en los Estados Unidos de Norte América. Estudios similares llevados a cabo por otros investigadores, particularmente por PALMER (1945), han confirmado y ampliado las observaciones de CHRISTIE y PETERSEN.

Uno de los hechos de mayor trascendencia en la epidemiología de la histoplasmosis tiene lugar en 1949, cuando EMMONS aísla del suelo el *Histoplasma capsulatum* y demuestra sin lugar a dudas que este hongo se desarrolla activamente en la tierra como un saprofito.

Aproximadamente, a partir del año 1947 se comenzó a acumular informaciones y pruebas que indicaba que el *H. capsulatum* estaba comprendido en una serie de epidemias y que la infección era, frecuentemente benigna (WASHBURN, TUOHY y DAVIS, 1948; FELDMAN y SABIN, 1948). Los estudios productivos de FURCOLOW y GRAYSTON (1953), GRAYSTON y FURCOLOW (1953) y SALVIN, FURCOLOW y Nis-

HIO (1954) no solamente establecieron, sin duda alguna, la relación del *H. capsulatum* a brotes de enfermedad epidémica, sino también demostraron que el reservorio del hongo era la tierra contaminada y que la vía de infección era por el tracto respiratorio. Aunque la histoplasmosis en seres humanos fué descrita por primera vez en Panamá hace ya cierto tiempo (DARLING, 1906), el hongo causante de esta enfermedad sólo recientemente ha sido aislado del suelo en una localidad tropical de América (AJELLO, 1954).

La denominada "Cueva de las Lechuzas" cercana a Tingo María, fué descrita adecuadamente por primera vez por ANTONIO RAIMONDI (1874). Uno de los caracteres más notables de ésta gran caverna natural es la presencia de un gran número de *Steatornis caripensis*, ave rara y muy valiosa por el aceite que se obtiene de su grasa. Esta ave, conocida con el nombre vulgar de Guacharo, fué descubierta y designada originalmente con el nombre de *S. caripensis* por ALEX VON HUMBOLDT (1814), quien la encontró en la cueva de los Guacharos del Valle de Caripe en Venezuela. Actualmente se conoce la existencia de estas aves nocturnas y frugívoras solamente en tres cuevas del Perú, una en Venezuela y otra en la isla de Trinidad. La "Cueva de las Lechuzas" aun en la actualidad sirve de refugio a gran número de especímenes del *S. caripensis*, por lo que es frecuentada por la gente que captura dicha ave con el objeto de obtener el aceite que de ella extrae, como en los días de von Humboldt y Raimondi.

Informaciones de la así llamada "Fiebre de Tingo María" y su relación con visitas a la "Cueva de las Lechuzas" han sido conocidos desde hace diez años, aproximadamente, por la profesión médica del Perú. Ciertas referencias sugirieron la posible relación de la enfermedad a la infección con un hongo. El significado de la asociación con las deyecciones de las aves en la epidemiología de histoplasmosis, sólo ha sido reconocida recientemente (ZEIDBERG, AJELLO, DILLON y RUNYON, 1952).

Debido a: 1) el cuadro clínico de la "Fiebre de Tingo María"; 2) la relación de visitas a una cueva; y 3) el contacto probable con las partículas de tierra inhaladas procedentes de áreas contaminadas con las deyecciones de las aves, les sugirió a los autores que un estudio de la tierra de la "Cueva de las Lechuzas", no sólo podría proporcionar evidencia respecto con la posible causa de la "Fiebre de Tingo María", sino también progresaría el conocimiento de la distribución de hongos patógenos en la América del Sur.

MATERIALES Y METODOS

A fines del mes de abril de 1955, se obtuvo muestras de tierra de cuatro sitios diferentes de la "Cueva de las Lechuzas". Muestra número 1 recogida del lado derecho de la entrada; número 2, del lado derecho del fondo de la segunda cámara grande; número 3, del lado izquierdo del frente de la segunda cámara; y número 4, del fondo derecho de la primera parte de la cueva. Cada muestra fué dividida en dos partes iguales; una parte se usó para ensayos de aislamiento con métodos de cultivo e inoculaciones en animales, efectuados en el Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública de Lima, y la otra se remitió por vía aérea al Mycology Unit, Communicable Disease Center Laboratory Branch, United States Public Health Service, Chamblee, Georgia.

El método usado con las muestras retenidas en Lima fué el siguiente: Se suspende 20 gramos de tierra con 100 ml. de solución salina (CINa, 0.85%); se agita y se filtra a través de gasa y algodón. Después de una hora de reposo, se centrifuga el líquido filtrado, luego el líquido se mezcla con penicilina y streptomycina en una concentración final de 8.000 unidades de cada uno por ml. Se siembra en medios de agar sangre y de Sabouraud, y se inocula tres pericotes por vía intraperitoneal con el líquido filtrado procedente de cada una de las cuatro muestras de tierra. La observación de los cultivos se realiza durante 30 días. Se sacrifica uno de los pericotes de cada grupo al finalizar las seis semanas y el otro a los tres meses. Se realiza exámenes macroscópicos, microscópicos y de cultivos del hígado, bazo y médula ósea de estos animales.

Las muestras recibidas en los Estados Unidos fueron examinadas para determinar la presencia del *H. capsulatum* por inyección intraperitoneal en pericotes del líquido sobrenadante de suspensiones de tierra; así como por cultivos de porciones de hígado y bazo. El método, originalmente, fué desarrollado por STEWART y MEYER (1932) para el aislamiento de *Coccidioides immitis* de tierra y ha sido modificado por otros científicos (EMMONS, 1949; AJELLO y RÜNYON, 1953). Con las muestras de Tingo Maria se usó el siguiente procedimiento:

1. Una muestra de tierra de unos 10 gr., íntegramente mezclada, sirvió para hacer una suspensión de 30 ml. de solución salina (CINa, 0.85%) conteniendo 5.000 unidades de penicilina y 1.000 unidades de streptomycina por ml.

2. Después de agitar enérgicamente, se deja sedimentar durante una hora. Este intervalo permite el depósito de partículas pesadas e inactivación de bacterias patógenas, que podrían encontrarse en la tierra.

3. Se extrae con pipeta, 5 ml. del sobrenadante y se inyecta un ml. por vía intraperitoneal en cada uno de cuatro pericotes.

4. Después de ocho semanas, se sacrifica los pericotes y se siembra porciones pequeñas de sus hígados y bazo en tubos de agar dextrosa-peptona neutra¹. Se inocula tejidos de cada pericote en cuatro tubos de este medio, dos tubos con hígado y dos con bazo, haciendo un total de 16 tubos inoculados por cada muestra original de la tierra.

5. Se incuba los cultivos a 25°C. y se examinan durante seis semanas para comprobar la presencia de hongos patógenos.

RESULTADOS

Los cultivos y las inoculaciones en animales efectuados en el Instituto Nacional de Higiene de Lima para este estudio, no rindieron nada de interés inmediato. Los hongos aislados eran de especies no patógenas, y ningún cultivo dió la evidencia positiva de la presencia de *H. capsulatum*.

De las cuatro muestras enviadas a los Estados Unidos, tres fueron negativas por el procedimiento expuesto arriba. De una de las muestras, número 2, correspondiente a la parte de la cueva donde se concentra la población de aves se obtuvo cultivos de *H. capsulatum* en 11 de los 16 tubos inoculados de acuerdo con la etapa número cuatro del procedimiento indicado. La fig. 1 exhibe un cultivo típico de este tipo (B), al lado de otros igualmente positivos pero que contienen al mismo tiempo otros microorganismos saprofitos.

El desarrollo en los tubos de aislamiento primario fué en principio húmedo y en partes sumergido, pero pronto adquirió aspecto algodonoso de color blanco. Se produjeron en abundancia los grandes conidios, característicos de *H. capsulatum*, con paredes gruesas y tuber-

¹	Neopeptona (Difco)	1.0 gm.
	Dextrosa	1.0 "
	Agar	2.0 "
	Agua destilada c.s.p.	100.0 ml.

Se ajusta a pH.7 antes de esterilizar en autoclave a 120°C. durante 10 minutos. Después de enfriar, se agrega 40 unidades de penicilina y 20 unidades de streptomycina por ml.

culadas y con diámetro de 12 a 18 micras, (fig. 3 y 4). Con el tiempo, la superficie de la colonia se tornó amarillenta.

Se convirtió fácilmente los cultivos aislados de las muestras de Tingo María a la fase de levadura mediante subcultivos en serie, en tubos de agar infusión de cerebro-corazón², incubados a 37°C.

DISCUSION

Debido a la conocida historia de una enfermedad no diagnosticada después de visitas a la cueva en la que ahora se conoce la presencia de *H. capsulatum*, los resultados comunicados en este estudio son de importancia para la salud pública. Basándose en este aislamiento se planeó y se llevó a cabo una encuesta mediante pruebas intradérmicas con histoplasmina y tuberculina en el área de Tingo María, cuyos resultados fueron presentados por el doctor PÉREZ LAGOS en el Segundo Congreso Nacional de Medicina del Perú, celebrado en Lima en octubre de 1955. La presencia de un número significativo —más de 43% de reacciones positivas a histoplasmina de esta encuesta— indica claramente que el problema de esta infección se relaciona no sólo a visitas a la cueva sino también implica al área circundante y, probablemente, otras numerosas partes de la vertiente oriental de los Andes, donde el clima, la humedad y los factores ambientales se combinan determinando condiciones favorables para el desarrollo del hongo.

Desde el punto de vista clínico, parece que la etiología de la "Fiebre de Tingo María" puede ser esclarecida. El reciente informe de los doctores CELSO ARELLANOS y JOSÉ GÁLVEZ BRANDON, que también fue presentado en el Segundo Congreso Nacional de Medicina del Perú, proporciona la evidencia final y concluyente por el aislamiento de *H. capsulatum* en dos casos clínicos típicos correspondientes a pacientes que habían visitado la cueva de Tingo María.

Es de la mayor importancia que los resultados positivos fueran obtenidos de muestras de tierra pertenecientes al área donde *S. caripensis* es más numeroso, desde que la predilección del *H. capsulatum* por los lugares donde se encuentran aves ha sido establecida y confirmada no sólo por los estudios de ZEIBERG y colaboradores (1952 y 1954) sino también por los de EMMONS (1954) y GRAYSTON y FURCOLOW

²	Infusión de cerebro-corazón (Difco)	3.7 %
	Agar	2.0 ..
	Agua destilada c.s.p.	100.0 ml.

Se esteriliza el medio en autoclave a 120°C. durante 10 minutos.

(1953). Además estudios que se efectúan actualmente en Tennessee indican que las aves a través de sus deyecciones, indirectamente crean condiciones en el suelo favorables para el desarrollo del *H. capsulatum*, anulando la competencia de los demás microorganismos que de otra manera inhibirían dicho desarrollo. A la lista de aves (gallina, paloma doméstica) conocida hasta ahora como que intervienen en esta relación ecológica debería agregarse el "Guacharo" (*S. caripensis*).

RECONOCIMIENTOS

Los autores desean expresar sus sinceros agradecimientos a los doctores Oscar Rondón S. y Manuel Fernández S. del Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública de Lima por sus esfuerzos en la preparación de cultivos e inoculaciones en animales; igualmente, expresan reconocimiento a la Unidad Sanitaria del Servicio Cooperativo Interamericano de Salud Pública de Tingo María y al Dr. Wilfredo Flores B., Jefe de la Unidad, por su ayuda en obtener las muestras de tierra de la cueva; finalmente dejar constancia de gratitud al Dr. Michael L. Furcolow, Chief, Kansas City Field Station, Communicable Disease Center, United States Public Health Service, Kansas City, Kansas, por las valiosas sugerencias y referencias proporcionadas.

SUMARIO

1. Se informa acerca del aislamiento de *H. capsulatum* en una de cuatro muestras de tierra procedentes de la "Cueva de las Lechuzas" en Tingo María, Perú.

2. El aislamiento se hizo de tierra obtenida en el área de la cueva, en la cual el ave nocturna frugívora *S. caripensis* es más abundante.

3. Se discute la importancia de la presencia de *H. capsulatum* en la tierra y su relación con la "Fiebre de Tingo María".

SUMMARY

1. There is reported the isolation of *H. capsulatum* from one of four specimens of soil from the "Cueva de las Lechuzas" at Tingo María, Perú.

2. The isolation was made from soil collected in the area of the cave where the nocturnal fruit-eating *S. caripensis* is most abundant.

3. The significance of the presence of *H. capsulatum* in the soil and its relationship to "Tingo María Fever" are discussed.

REFERENCIAS

- AJELLO, L.
1954 Occurrence of *Histoplasma capsulatum* and Other Human Pathogenic Molds in Panamanian Soil. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 3: 897-904.
- AJELLO, L. y RUNYON, L. A.
1953 Infection of Mice with Single Spores of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bact.* 66: 34-40.
- CONANT, N. F. y col.
1944 Manual of Clinical Mycology. p. 151-165. W. B. Saunders Co., Philadelphia and London.
- CHRISTIE, A., PETERSEN, J. C.
1945 Pulmonary Calcification in Negative Reactors to Tuberculin. *Am. J. Pub. Hlth.* 35: 1131-1147.
- DARLING, S. T.
1906 A Protozoon General Infection Producing Pseudotubercles in the Lungs and Focal Necroses in the Liver, Spleen and Lymphnodes. *J. A. M. A.* 46: 1283-1285.
- EMMONS, C. W.
1949 Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Soil. *Pub. Hlth. Rep.* 64: 892-896.
- EMMONS, C. W.
1954 The Significance of Saprophytism in the Epidemiology of the Mycoses. *Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser II*, 17: 157-166.
- FEIDMAN, H. A. y SABIN, A. B.
1948 Pneumonitis of Unknown Etiology in a Group of Men Exposed to Pigeon Excreta. *J. Clin. Invest.* 27, 533.
- FURCOLOW, M. L. y GRAYSTON, J. T.
1953 Occurrence of Histoplasmosis in Epidemics. Etiologic Studies. *Am. Rev. Tuberc.* 68: 307-320.
- GRAYSTON, J. T. y FURCOLOW, M. L.
1953 The Occurrence of Histoplasmosis in Epidemics — Epidemiological Studies. *Am. J. Pub. Hlth.* 43: 665-676.
- HUMBOLDT von. A.
1814 Voyage aux Regions Equinoxiales du Nouveau Continent. Traducción inglesa en "Green World of the Naturalists" 1948 von Hagen, V. W., Greenberg Publisher, New York.
- PALMER, C. E.
1945 Nontuberculous Pulmonary Calcifications and Sensitivity to Histoplasmin. *Pub. Hlth. Rep.* 60: 513-520.
- RAIMONDI, A.
1874 El Perú. Parte Preliminar. Imprenta del Estado. Lima, Perú. T. I. 336-340.
- SALVIN, S. B. FURCOLOW, M. L. y NISHIO, J.
1954 Serologic Studies on Outbreak of Pulmonary Disease at Camp Gruber, Okla. *A. M. A. Arch. Inst. Int. Med.* 93: 906-910.
- STEWART, R. A. y MEYER, K. F.
1932 Isolation of *Coccidioides immitis* (Stiles) from Soil. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 29: 937-938.

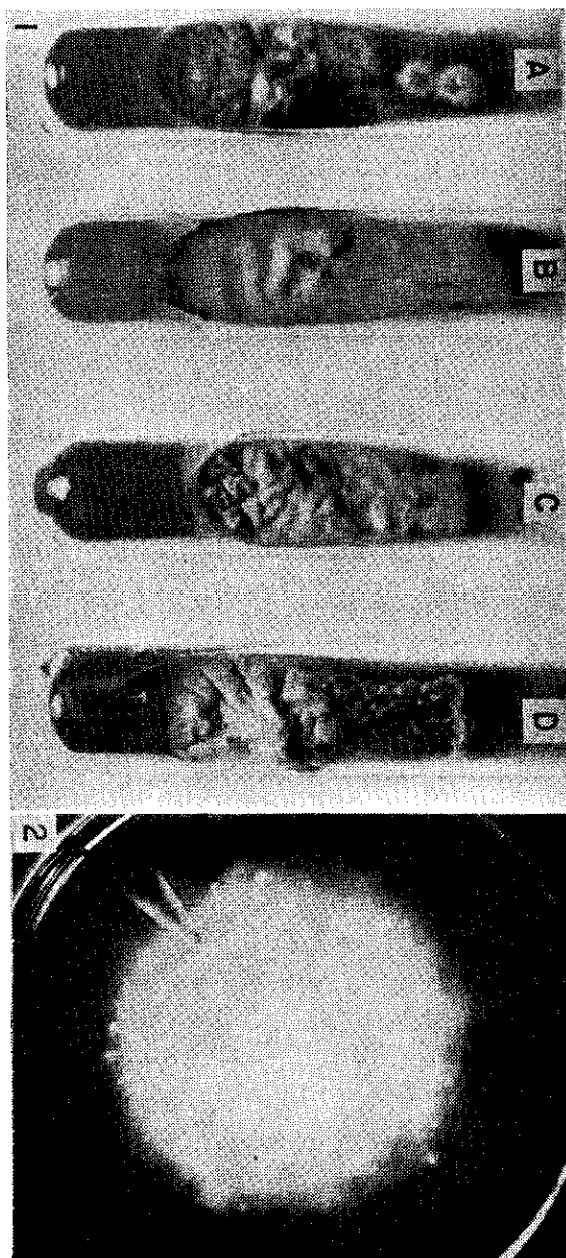
- WASHBURN, A. M., TUOHY, J. H. y DAVIS, E. L.
1948 Cave Sickness: A New Disease Entity? *Am. Pub. Hlth.* 38: 1521-1526.
- ZEIDBERG, L. D., AJELLO, L., DILLON, A., y RUNYON, L. C.
1952 Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Soil. *Am. J. Pub. Hlth.* 43: 930-935.
- ZEIDBERG, L. D. y AJELLO, L.
1954 Environmental Factors Influencing the Occurrence of *Histoplasma capsulatum* and *Microsporium gypseum* in Soil. *Jour. Bact.* 68: 156-159.

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Lámina I

Fig. 1.—Tubos de cultivo que muestran el aislamiento del *Histoplasma capsulatum*, en tres de los cuales (A, C y D) se observan algunos microorganismos saprofitos que han sobrevivido al pasaje a través del ratón. Los tubos A y B fueron inoculados con trocitos de hígado; los C y D, de bazo.

Fig. 2.—Aspecto macroscópico característico de la colonia del *H. capsulatum*, aislado de la tierra procedente de la "Cueva de las Lechuzas" de Tingo Maria.



EXPLICACION DE LA GRAFICA

Lámina II

Fig. 3.—Microfotografía del micelio y las conideas de la cepa del *H. capsulatum* procedente de Tingo Maria (300X), pudiéndose observar con claridad los tubérculos o mamelones de las conideas.

Fig. 4.—Detalle de la ornamentación característica de las esporas del *H. capsulatum* (980X).

