

## Características morfológicas y fisiológicas de hongos patógenos en Costa Rica (Dematiaceae)

Carmen Valiente\* y Eugenia Quesada\*

\*Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(Rec.4-VII-1990. Acep.27-X-1990)

**Abstract:** Forty one strains of dematiaceous fungi from the Mycology collection of the University of Costa Rica were studied. Thirty three were pathogenic (*Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium carrionii*, *Xylohypha bantiana*, *Exophiala jeanselmei*, *Rhinocladiella aquaspersa*, *Phialophora verrucosa*) and the other eight were contaminants (*Hormodendrum* sp.). Morphological studies were done using the slide culture technique. The physiological criteria used were: urease production, gelatin and Loeffler media liquefaction; xantine, tirosine, starch and caseine hydrolysis; nitrate utilization; carbohydrate uptake; sensitivity to cicloheximide and thermotolerance in glucose-Sabouraud medium. The physiological tests did not provide characteristic patterns for the different genera of pathogenic fungi, even though these differences were detected in non pathogenic fungi; the tests may be useful for the quick separation of both groups. Physiological test may have a limited value in the identification of fungi and the morphological analysis cannot be substituted by physiological studies

**Key words:** Dematiaceae, mycosis, black fungi, mycophysiology.

Los hongos de la familia Dematiaceae han sido estudiados desde hace muchos años, debido al gran interés que tienen desde el punto de vista médico y veterinario. Son agentes etiológicos de entidades clínicas como cromomicosis, tinea nigra, absceso subcutáneo, cladosporiosis, queratitis micótica, endocarditis, dermatomycosis y onicomycosis (Hironaga y Watanabe 1980, McGinnis 1983). A esta familia de hongos negros pertenece una gran variedad de géneros. Son morfológicamente muy relacionados y se caracterizan por poseer modalidades distintas de esporulación según el género.

Por la importancia del grupo se han desarrollado estudios morfológicos y fisiológicos para su correcta identificación (Marcano 1978, Padhye 1978, Honbo *et al.* 1984, Dixon y Salkin 1986). En este trabajo presentamos los resultados de un estudio simultáneo de las características morfo-fisiológicas de algunos hongos dematiáceos de nuestra micoteca, para establecer cuales pruebas son adecuadas para identificar especies. Además, lo comparamos con

hongos saprófitos del género *Hormodendrum*, un contaminante frecuentemente aislado en nuestro medio, que es necesario identificar.

### MATERIAL Y METODOS

**1. Cultivos:** Seleccionamos 41 cepas (Micoteca de la Facultad de Microbiología, Universidad Costa Rica). Estas se han mantenido en Sabouraud Glucosa Agar por tiempos variables:

a.- Aislados de casos de cromomicosis: *F. pedrosoi* (n=21), *C. carrionii* (*Cladophialophora ajelloi*) (n=6), *R. aquaspersa* (*Acrotheca aquaspersa*) (n=1), *P. verrucosa* (n=1).

b.- Aislados de casos de cladosporiosis: *X. bantiana* (*Cladosporium trichoides*) (n=2).

c.- Aislados de absceso subcutáneo: *E. jeanselmei* (n=2).

d.- Aislado como contaminante de laboratorio: *Hormodendrum* sp. (n=8).

**2. Estudio morfológico:** Se realizaron cultivos en lámina en medios de Sabouraud

Glucosado y Papa-Zanahoria. Se incubaron a temperatura ambiente (22°-25°C) por un período de 45 días, con observaciones semanales.

**3. Estudio fisiológico:** Todas las pruebas se incubaron a temperatura ambiente (22-25°C), por un período máximo de 30 días, efectuándose lecturas semanales. Los métodos fueron:

a.-Producción de ureasa: Agar Urea de Christensen (Difco).

b.-Licuefacción de la gelatina: Gelatina Nutritiva (Difco).

c.-Hidrólisis de la xantina y tirosina: método descrito por Mariat (1965).

d.-Hidrólisis de la caseína: medio Agar Leche (Mackinnon 1954).

e.-Hidrólisis del almidón: el medio usado fue Agar Almidón (Mackinnon 1954).

f.-Licuefacción del medio de Loeffler: Difco.

g.-Utilización de nitratos: Czapeck Dox Agar (Difco).

h.-Asimilación de carbohidratos: (Langeron y Vanbreuseghem 1952, Mayorga y Close de León 1966). Se utilizaron los siguientes carbohidratos: glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, rafinosa y galactosa.

i.-Sensibilidad a la Cicloheximida: Mycosel Agar (B.B.L.).

j.- Termotolerancia:(Mackinnon 1954, Dixon y Salkin 1986).Se utilizó el medio de Sabouraud Glucosado en tubos (18 X 150mm), se inocularon tres tubos por cada una de las cepas y se incubaron a temperaturas de 25°, 35° y 42°C, por un período máximo de 30 días, efectuándose lecturas semanales.

## RESULTADOS

**Morfología:** No se encontraron diferencias entre el crecimiento de las cepas en los medios de Papa-Zanahoria y Sabouraud Glucosado. Sin embargo, en ambos casos la esporulación fue escasa después de un mes de incubación. Todas nuestras cepas poseen morfología macroscópica similar, encontrándose como hongos filamentosos, de color negro, gris o verde oliváceo y de lento crecimiento. Al examen microscópico estos hongos poseen hifas septadas fuliginosas y su diferencia principal está en el tipo de esporulación, que es característica de cada género.

**Fisiología:** Cuatro pruebas dieron resultados positivos para todos los hongos: producción de

ureasa, utilización de nitrato, asimilación de carbohidratos y resistencia a la Cicloheximida. Ninguna de las cepas patógenas hidroliza el medio de Loeffler, pero las cepas de *Hormodendrum* sí lo hacen.

Otras pruebas dieron resultados variables:

a) Licuefacción de la gelatina: dieron una prueba positiva todas las cepas de *Hormodendrum* sp. y de *C.carrionii*, y dos cepas de *F.pedrosoi*. El resto de las cepas, a pesar de mostrar un buen crecimiento en este medio, dieron un resultado negativo.

b)-Hidrólisis del almidón: solamente una cepa de *C.carrionii* dio resultado positivo.

c)-Hidrólisis de la caseína: aunque todas las cepas crecen bien en el medio, la prueba solo fue positiva para *X. bantiana*, tres cepas de *C.carrionii* y todas las cepas de *Hormodendrum* sp.

d)-Hidrólisis de la xantina: todas las cepas crecieron bien pero presentaron una hidrólisis negativa.

e)-Hidrólisis de la tirosina: todas las cepas de *E. jeanselmei* y de *Hormodendrum* sp. dieron una prueba positiva.

f)-Termotolerancia: Todas las cepas tienen como temperatura óptima de crecimiento la temperatura ambiente. A 35°C no creció ninguna cepa de *Hormodendrum* ni la de *R.aquasparsa*; las otras crecieron lentamente. A 42°C no creció ninguna de las cepas.

## DISCUSION

Se encontraron los patrones morfológicos característicos de género y especie correspondientes a los indicados por diversos autores en Dematiaceae. Un problema de este tipo de estudio, es el prolongado tiempo de incubación que necesitan estos hongos para crecer y producir su completa esporulación. Así, para fines prácticos del laboratorio clínico, no sirven para proporcionar un diagnóstico rápido. En ese caso debe usarse el examen directo para buscar las estructuras del talo fumagoide. Algunas pruebas fisiológicas pueden ser de mucha utilidad al ubicarnos en un determinado género, mientras se obtiene la descripción morfológica definitiva. Encontramos que todos los hongos patógenos son resistentes a la cicloheximida, por lo que esta prueba no tiene utilidad para la diferenciación de las cepas. Sí la tiene en el laboratorio clínico en los aislamientos primarios, de-

biendo utilizarse rutinariamente los medios de Sabouraud y de Mycosel. Es muy importante el hecho de que todas las cepas crecieron bien a temperatura ambiente y más lentamente a 35°C, en donde únicamente no crecieron las cepas de *Hormodendrum* sp. y la cepa de *R.aquaspersa*. Puede entonces considerarse que el crecimiento a 35°C es conveniente para diferenciar entre las cepas de hongos negros patógenos y saprófitos, lo que concuerda con Espinel-Ingroff *et al.* (1988), quienes determinaron que la termotolerancia es una prueba de mucha ayuda para la identificación de estos hongos. Las pruebas bioquímicas realizadas en nuestro estudio no mostraron patrones característicos para todos los géneros y especies. Sin embargo, la licuefacción del medio de Loeffler puede servir como un parámetro para establecer la capacidad patogénica de una cepa, ya que únicamente las especies del género *Hormodendrum* produjeron esta licuefacción. Debe realizarse un estudio con más cepas saprófitas, debido a que otros autores (Espinel-Ingroff *et al.* 1988) no encontraron correlación entre la licuefacción del medio de Loeffler y la falta de patogenicidad de las cepas; además, algunos de nuestros hongos patógenos no fueron capaces de crecer en este medio. La especie *F. pedrosoi* presentó un patrón semejante en casi todos los casos. Este resultado puede ser de valor en nuestro medio dado que, con excepción de un caso, este hongo es el único agente etiológico aislado de los casos de cromomycosis. *P. verrucosa* y *E. jeanselmei* presentan un patrón propio, el cual correlaciona con los resultados obtenidos por otros autores (Shoji *et al.* 1986, Padhye 1978). Sin embargo, en nuestras observaciones, hay una diferencia para *P.verrucosa*, ya que el resultado de la hidrólisis de la tirosina fue negativo, al contrario de lo que anteriormente se ha informado (Shoji *et al.* 1986). Las cepas de *C.carrionii* dieron resultados variables, situación que ya ha sido descrita (Honbo *et al.* 1984). Lo mismo ocurre con los resultados obtenidos para *X.bantiana* (Hironaga y Watanabe 1980); una cepa de estas creció más a 35°C que a temperatura ambiente pero no a 42°C, lo cual concuerda con lo encontrado por Honbo *et al.* (1984). Según el auxonograma de carbohidratos se observó que algunos hongos como *E.jeanselmei* y *P.verrucosa*, mostraban en el medio con rafinosa un crecimiento colonial distinto al encontrado en

los medios con los otros azúcares. Al observar la morfología microscópica de estas colonias, se encontró que las hifas eran más gruesas e irregulares que las que presentaban estos mismos hongos en los cultivos en lámina. Además, el crecimiento en rafinosa tuvo menos esporulación y en *P.verrucosa*, las fiálides fueron defectuosas, al tener un collarite incompleto.

En general, podemos concluir que las pruebas fisiológicas, si bien en algunos casos pueden ayudar a la identificación de algunos de estos hongos, no son concluyentes y debe siempre recurrirse al estudio de la morfología de las cepas aisladas. Sin embargo, algunas pruebas como la licuefacción del medio de Loeffler y el crecimiento a 35°C, pueden ser auxiliares importantes mientras se obtiene el cultivo definitivo.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Gonzalo Marín Arias, Mario Vargas Vargas y Julio García Fernández por su colaboración en la revisión de este trabajo, y a Orlando Montero Ugalde por su ayuda desinteresada.

C. Valiente es miembro del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

#### RESUMEN

Cuarenta y una cepas de hongos dematiáceos de la Micoteca de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, fueron estudiados morfológica y fisiológicamente. Treinta y tres fueron cepas de hongos patógenos (*Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium carrionii*, *Xylohypha bantiana*, *Exophiala jeanselmei*, *Rhinochadiella aquaspersa*, *Phialophora verrucosa*) y ocho fueron contaminantes de laboratorio (*Hormodendrum* sp.). Las pruebas realizadas fueron producción de ureasa, licuefacción de la gelatina y del medio Loeffler, hidrólisis de xantina, tirosina, caseína y almidón, utilización de nitrato, asimilación de carbohidratos, sensibilidad a la cicloheximida y crecimiento en cultivos en lámina en medios de Sabouraud Glucosado y Papa Zanahoria. Todas estas pruebas fueron incubadas a temperatura ambiente (22-25°C) por treinta días, con lectu-

ras semanales. También se realizaron pruebas de termotolerancia en medio de Sabouraud Glucosado. Los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas no mostraron patrones característicos para los diferentes géneros y especies de los hongos patógenos, pero sí se encontraron algunas diferencias con los hongos saprófitos. Sin embargo, consideramos que estas pruebas aunque son auxiliares importantes en la identificación de estos hongos, siempre deben hacerse conjuntamente con el estudio de las características morfológicas.

### REFERENCIAS

- Dixon, D. M. & I.F. Salkin. 1986. Morphologic and Physiologic studies of three Dematiaceous Pathogens. *J.Clin. Microbiol.* 24:12-15.
- Espinel-Ingroff, A., P. Goldson, M. McGinnis & T. Kerkering. 1988. Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 2:301-307.
- Honbo, S., A.A. Padhye & L. Ajello. 1984. The relationship of *Cladosporium carrionii* to *Cladophialophora ajelloi*. *Sabouraudia* 22:209-218.
- Hironaga, M & S.Watanabe. 1980. Cerebral Phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium bantianum*: a case in a female who had cutaneous alternariosis in her childhood. *Sabouraudia* 18:229-235.
- Langeron, M. & R. Vanbreuseghem. 1952. *Precis de Mycologie*. Masson & Cien. Paris, Francia. 431p.
- Mackinnon, J.E. 1954. A contribution to the study of the causal organism of Maduromycosis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 48:470-480.
- Marcano, C. 1978. *Cladosporium castellani*, study of variants. p.19-24 In *The Black and White Yeast*. Proc. IV Int. Conf. Mycoses, PAHO. Scientific Publication N° 356, Brasil.
- Mariat, F. 1965. Etude comparative de souches de *Nocardia* isolées de Mycetomes. *Ext. Ann. Inst. Pasteur*, Tome 109.
- Mayorga, R. & J.E. Close de Leon. 1966. Sur une souche de *Madurella grisea* sporifère d'un mycetome Guatemalteque a grains noirs. *Sabouraudia* 4:210-214.
- McGinnis, M.R. 1983. Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis and mycology. *J. of Amer. Acad. of Dermatol.* 8:1-16.
- Padhye, A. 1978. Comparative study of *Phialophora jeanselmei* and *P. gougerotii* by morphological, biochemical and immunological methods. p.60-65 In *The Black and White Yeast*. Proc. IV Int. Conf. Mycoses, PAHO. Scientific Publication N° 356, Brasil.
- Shoji, A., A.A. Padhye, P.G. Standard, L. Kaufman & L. Ajello. 1986. The relationship of *Phialophora verrucosa* to *Phialophora americana*. *J. Med. Vet. Mycol.* 24:23-34.