

# Inoculación experimental de *Sporotrichum schenckii* en embrión de pollo\*

por

German F. Sáenz\*\*

(Recibido para su publicación el 21 de abril de 1960)

En 1941, MOORE (8) inoculó el *Sporotrichum schenckii* en membrana coriolantoica de embriones de pollo, abarcando su estudio, de un modo preferente, el aspecto histopatológico de las lesiones encontradas. En 1951, BRUECK y BUDDINGH (1) utilizando la vía del saco vitelino, inocularon pus de lesiones humanas, con miras a demostrar el valor de este método para el aislamiento y diagnóstico de la infección.

No existiendo en la literatura otros trabajos referentes a este tema, se inició un estudio en el cual se deseaba conocer las variaciones morfológicas que podría sufrir especialmente la fase micelial del hongo, al ser inoculada por diferentes vías en huevos en diversos estadios de desarrollo. Además se pretendió comprobar si habría diseminación del hongo a otras regiones embrionarias a partir de la inoculación en una área determinada.

En el presente trabajo se relatan los resultados obtenidos en las inoculaciones experimentales de *S. schenckii* en huevos embrionados por diez vías diferentes, indicándose también, aunque en forma somera, las modificaciones anatómicas e histológicas de las regiones embrionarias afectadas.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron huevos embrionados, de gallinas Leghorn, de un peso promedio de 60 gramos. Usamos en la mayoría de los casos lotes de cinco para cada tipo de inoculación, los cuales recibieron de 0.1 a 0.3 ml de suspensión

---

\* Trabajo basado en la Tesis de Grado del mismo nombre, presentada a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

\*\* Departamento de Parasitología, Escuela de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

del hongo. Asimismo, dos o tres huevos fueron inoculados con solución salina y usados como testigos. Los embriones permanecieron siempre a 37.5°C y a una humedad relativa de 50 por ciento. Las inoculaciones se efectuaron en períodos comprendidos entre los 4 y 18 días.

Para la obtención de la fase micelial del hongo se utilizó una cepa de *S. schenckii* (fig. 1) recién aislada de un caso gomoso humano. El hongo fue cultivado a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) por 72 a 96 horas, en 5 ml de Sabouraud glucosado. Antes de efectuar las inoculaciones, se centrifugaron los tubos, suspendiendo el sedimento en un volumen aproximado de 4 ml de solución salina estéril.

Fueron realizados además, unos pocos experimentos usando la fase levaduriforme del hongo (fig. 2), obtenida en cultivos de agar-sangre con 2 por ciento de glucosa a 37°C.

En general se adoptaron las consideraciones técnicas clásicas relativas a inoculaciones en embriones de pollo (2). Las pequeñas modificaciones que se introdujeron a las técnicas se refieren en especial a la apertura inicial de los huevos.

Los embriones fueron inoculados del siguiente modo:

Saco vitelino	7 días
Membrana corioalantoica	11 días
Cavidad alantoica	11 días
Saco del albumen	7 días
Cavidad amniótica	11 días
Intracerebral	10-18 días
Intramuscular	13-16 días
Endovenosa	13-16 días
Membrana de la cáscara	4-15 días

El material sospechoso obtenido en los huevos inoculados se sembró de rutina en Sabouraud líquido glucosado, en el agar glucosado de Sabouraud y, en agar sangre, para comprobar principalmente la ausencia de bacterias.

En cada uno de los embriones se hizo un estudio macro y microscópico de la región inoculada y de los anexos, líquidos y órganos embrionarios. Los frotos fueron teñidos por los métodos de Gram (5) y del ácido peryódico-Schiff (técnica P.A.S.) (7). Piezas de anexos y órganos del embrión se fijaron en formalina al 10 por ciento, se incluyeron en parafina y los cortes obtenidos se tiñeron por los métodos de hematoxilina-eosina (6), del P.A.S. y del Gram para tejidos (5).

## RESULTADOS

### INOCULACIÓN EN SACO VITELINO

Cinco embriones murieron a los 3, 4, 9, 11 y 13 días después de inoculados, no mostrando mayores alteraciones a no ser en los últimos un moderado subdesarrollo.

El anexo vitelino presentó en general, un mayor tamaño y un engrosamiento de su pared. En los dos últimos embriones no se observó indicio alguno que indicara el proceso de invaginación del saco vitelino a la cavidad abdominal. En los restantes anexos embrionarios no notamos alteraciones ostensibles.

Respecto a las características del hongo, la predominancia de formas vegetativas micelianas iniciales, fueron sustituidas finalmente por numerosas formas blastospóricas y enseudomicelio. Las formas en cigarro se hallaron en todos los casos, con mayor frecuencia en los últimos embriones (figs. 3, 4). Pudimos notar también, que el crecimiento del hongo era más acentuado en el área subyacente al saco vitelino (fig. 5), nunca intracelularmente y, que la infección no se extendió a otros terrenos embrionarios.

Testigos: nacen a los 22 días.

#### INOCULACIÓN EN MEMBRANA CORIOALANTOICA (M.C.A.)

Cinco embriones murieron entre el cuarto y sétimo días después de inoculados sin mostrar anomalías en cuanto al tamaño, pero sí manifestaciones hemorrágicas. Macroscópicamente las membranas corioalantoicas mostraron regiones edematosas y pálidas, especialmente en el área de inoculación. Microscópicamente las lesiones eran de tipo granulomatoso con predominio de glóbulos rojos y monolinfoides. En los otros anexos no se notaron anomalías evidentes.

En los embriones que murieron al sétimo día se observó la predominancia de la fase parasitaria o tisular del hongo, con las típicas formas de cigarro, notándose además un paso progresivo bien definido a partir del inóculo micelial, encontrándose como elementos intermediarios, levaduras mono y multigemantes, pseudomicelios cortos y pleomórficos, formas redondeadas y escaso promicelio (figs. 6, 7, 8).

La inoculación en la M.C.A. provoca un crecimiento localizado del hongo con escasa tendencia a difundirse a otros anexos o al propio embrión. En los cortes histológicos se pudo demostrar un mayor crecimiento del hongo en la región subcoriónica (fig. 9).

Testigos: nacen a los 22 días.

#### INOCULACIÓN EN CAVIDAD ALANTOICA

Un embrión murió a los tres días y otro a los nueve. Tres más fueron matados intencionalmente a los 4, 5 y 7 días después de inoculados con el propósito de estudiar en forma progresiva tanto el líquido alantoico como las características del hongo.

Conforme avanzaba el período de incubación, se pudo notar el predominio manifiesto de la fase levaduriforme (fig. 10). A partir de los últimos embriones los cultivos resultaron ser positivos pero en forma escasa y, los frottes mostraron pocos elementos del hongo. En general, no logramos observar

anormalidades claras en los embriones o anexos, a no ser los alantoicos moderadamente opacos y el saco vitelino engrosado en el último embrión. El líquido alantoico al principio grumoso y de color amarillo claro, tornóse al final blanquecino y casi sin grumos.

En los cortes efectuados se pudo demostrar que los anexos alantoicos no mostraban una reacción celular manifiesta; asimismo, se comprobó la escasez de los elementos del hongo, hecho que corrobora los resultados obtenidos en el estudio de los frotés y de los cultivos.

Testigos: nacen a los 22 días.

#### INOCULACIÓN EN CAVIDAD EXTRAEMBRIONARIA

Cinco embriones murieron en un período comprendido entre el cuarto y sexto días después de inoculados, mostrando alteraciones en su aspecto y tamaño, viéndose pálidos y subdesarrollados.

De un modo general, todos los anexos embrionarios mostraron anomalías evidentes, observándose exentos de sangre y flácidos. El líquido amniótico en la mayoría de los casos se presentó hemorrágico; el extraembrionario en los últimos embriones tornóse mucoso y escaso, bañando a manera de un exudado, los anexos circundantes de la cavidad extraembrionaria.

Las características del hongo tanto en el líquido extraembrionario como en los anexos contiguos, nos demuestran las propiedades pleomórficas del mismo. En los primeros huevos, este pleomorfismo se hace exagerado, para luego encontrar en los embriones que murieron posteriormente, un predominio de las formasseudomicelianas y de micelio vegetativo (figs. 11, 12, 13).

Testigos: nacen a los 23 días.

#### INOCULACIÓN EN SACO DEL ALBUMEN

De un lote de cinco huevos inoculados, se abrieron dos de ellos al octavo y noveno días con el propósito de comprobar la posible diseminación del hongo a la cavidad amniótica. Sin embargo, tanto en éstos como en un tercero que murió a los 14 días después de inoculado, no se logró demostrar tal proceso. Los dos restantes del lote nacieron normalmente. Los embriones estudiados no mostraron anomalías ostensibles y el albumen en general presentó modificaciones ligeras en su aspecto, cantidad y consistencia.

El albumen resulta ser un medio desfavorable para el hongo dada la pobreza de los cultivos positivos y por la escasez de los elementos del hongo en los frotés estudiados.

Desde el punto de vista morfológico se encontraron inicialmente formas micelinas irregulares débilmente coloreadas, blastosporas alargadas generalmente agemantes y, unseudomicelio pleomórfico (fig. 14). Del embrión que murió obtuvimos algún material albuminoideo de la región contigua a los tejidos propios del saco del albumen, logrando constatar que poseía principalmente elementos levaduriformes y en cigarro (fig. 15). También encontramos positivo el anexo vitelino en este caso. En un resto albuminoideo de uno de los

embriones nacidos, observamos elementos cocoides débilmente teñidos, algunos con cortas proyecciones, otros con su pared rota y otros en desintegración (fig. 16).

Testigos: nacen a los 22 días.

#### INOCULACIÓN EN CAVIDAD AMNIÓTICA

Cinco embriones murieron en un período comprendido entre el primero y segundo días después de inoculados y presentaron principalmente alteraciones en su aspecto, viéndose pálidos con zonas definidas de hemorragia. Por lo común todas las membranas extraembrionarias presentaron modificaciones en su aspecto y consistencia, siendo la más afectada la amniótica. El líquido amniótico siempre se mostró hemorrágico.

Debido probablemente al pequeño período de incubación post-inoculatorio, no logramos demostrar una diseminación del hongo a los tejidos intrínsecos del embrión, aunque sí escasamente a otros anexos y al líquido alantoico en los dos últimos embriones.

En el material amniótico (membrana y líquido), las características del hongo variaron desde las formas micelianas vegetativas, predominantes en los primeros casos (fig. 17), hasta la aparición de elementos principalmente redondeados y en seudomicelio (fig. 18). También se observaron en todos los frottes, conidias pequeñas, promicelio y células multigemantes (fig. 19). En las preparaciones efectuadas a partir de líquido traqueal logramos ver escasos elementos primordialmente redondeados pero no típicamente levaduriformes.

Testigos: de seis testigos, uno murió a las 40 y otro a las 72 horas; dos a los 5 y 6 días respectivamente y, dos nacieron a los 23 días.

#### INOCULACIÓN INTRACEREBRAL

La inoculación intracerebral del *S. schenckii* siempre fue fatal. En general notamos que embriones de 10 a 14 días son más susceptibles muriendo entre las 6 y 16 horas, mientras que los de 16 a 18 días, resistieron un mayor lapso de tiempo post-inoculatorio (hasta 32 horas). Todos los embriones presentaron un aspecto amarillento, con hemorragia generalizada en toda la bóveda craneana, inclusive en los ojos. Los anexos embrionarios denotaban alteraciones en su aspecto e irrigación.

La inoculación de la fase levaduriforme prolonga un poco más el período de supervivencia en embriones de 16 días. De cinco de ellos, uno murió a las 80 horas y los cuatro restantes entre las 48 y 70 horas después de la inoculación.

En el estudio de las preparaciones efectuadas a partir de material cerebral, en la primera experiencia, notamos la presencia de micelio profuso muy ramificado, con excepcionales conidias laterales. No encontramos blastogénesis. La mayor parte del micelio dio una débil reacción P.A.S. positiva.

La reacción celular encontrada en los cortes de cerebro fue localizada

y especialmente encontramos elementos linfoides, plasmacelulares y células rojas. En los mismos cortes se lograron observar "nidos micelianos", rodeados de una zona de necrosis manifiesta. En la inoculación de blastosporas, también se observaron "nidos levaduriformes" y necrosis moderada (fig. 20).

De seis testigos con 17 días, cuatro murieron a las 24 horas y dos a las 80 horas siguientes a la inoculación.

#### INOCULACIÓN INTRAMUSCULAR

Al inocular embriones de pollo por la vía intramuscular, se lograron diversos resultados según la edad de los embriones utilizados. De un lote de cinco embriones de 12 días, dos de ellos sobrevivieron, uno de los cuales presentó anomalías anatómicas en la pata comprometida. Ninguno evidenció proceso infeccioso alguno. De los fallecidos uno murió a las 24 horas y dos a las 72 horas después de la inoculación. Todos ellos mostraron hemorragia y edema generalizado en todo el miembro.

En general, tanto en los embriones como en los anexos embrionarios no se observaron lesiones.

Los cultivos efectuados a partir de material del área de inoculación fueron positivos para los tres embriones, con crecimiento de escasas colonias. Los frotos positivos mostraron algunas formaciones micelianas débilmente P.A.S. positivas y pocas formas aisladas (fig. 21).

Cuando tres embriones de 17 días fueron inoculados, se obtuvo una supervivencia absoluta, no lográndose demostrar infección alguna en los animales.

La inoculación de la fase levaduriforme en cinco embriones de 12 días, produjo la muerte de todos ellos en un espacio comprendido entre las 48 y 96 horas siguientes. En el estudio microscópico notamos elementos levaduriformes,seudomicelio y bacilariformes. Algunas de estas formas se notaron débilmente P.A.S. positivas.

Al inocular tres embriones de 18 días con esta fase del hongo, obtuvimos una supervivencia completa.

En la mayoría de las piezas estudiadas, pudimos comprobar en los cortes la presencia del hongo con las características morfológicas y tintoriales descritas en los frotos. En general, se notó en la región de inoculación, una moderada infiltración celular con predominio de células rojas (figs. 22 y 23).

De tres testigos inoculados con 12 días, solamente uno murió a las 48 horas siguientes, presentando hemorragia y edema en la pata inoculada.

#### INOCULACIÓN EN MEMBRANA DE LA CÁSCARA

De seis embriones inoculados con 4 días de incubación, murieron dos de ellos a los dos y cuatro días siguientes. El estudio micológico nos demostró cómo la membrana de la cáscara estaba invadida por trozos micelianos irregulares, gran cantidad de conidias pequeñas, conidias grandes de gruesa e irre-

gular pared, blastosporas, pseudomicelio pleomórfico y formas en cigarro (fig. 24). Muchos de estos elementos se mostraron débilmente positivos con el P.A.S., especialmente los micelianos (fig. 25).

Los cultivos de esta membrana fueron positivos con gran cantidad de colonias. En el embrión que murió a los cuatro días de inoculado, se comprobó la invasión de la membrana coriónica, de los anexos alantoicos y del líquido alantoico (fig. 26). Los polluelos nacidos, no manifestaron infección alguna y la mayoría de las membranas de la cáscara dieron cultivos positivos aunque no con la misma intensidad que los dos embriones que murieron.

Embriones con un período de incubación comprendido entre los 8 y 15 días no lograron infectarse. Los cultivos de la membrana de la cáscara, resultaron ser positivos con escasas colonias a los seis días. La morfología del hongo, típicamente pleomórfica, presentábase de preferencia en formas micelianas cortas e irregulares, débilmente teñidas y, en conidias pequeñas y piriformes.

Cinco testigos inoculados con solución salina estéril, de seis días, nacieron normalmente.

#### INOCULACIÓN ENDOVENOSA

Para realizar esta inoculación escogimos venas alantoicas por ofrecer mayores facilidades técnicas. Embriones de 13 a 16 días mueren entre las dos y doce horas siguientes. De 20 huevos, solamente en dos de ellos pudimos lograr hemocultivos positivos (monocloniales) seis días después. En las preparaciones de sangre de otros territorios embrionarios y en los cortes efectuados, no se logró poner en evidencia elementos del hongo.

Macroscópicamente, los embriones y líquidos embrionarios se presentaron moderadamente hemorrágicos. Sin embargo puede asumirse que gran parte de la hemorragia hallada en los líquidos se debiera a sangre extravasada.

De 20 embriones inoculados con solución salina estéril con períodos de incubación entre los 13 y 16 días, ocho murieron entre las 2 y 28 horas y cuatro entre las 30 y 72 horas siguientes y el resto nacieron normalmente.

#### DISCUSION Y CONCLUSIONES

En las regiones de inoculación se pudo demostrar una diferente susceptibilidad a la infección, inclusive variable en algunas de ellas, según el estado de desarrollo embrionario. Con respecto a esto último, BUDDINGH (3) al analizar los procesos infecciosos en embriones de pollo, dice: "Las agudas o marcadas diferencias en los efectos producidos por los diversos agentes infecciosos específicos, en los diferentes estadios de desarrollo embrionario, sugieren investigaciones sobre el problema de la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, por parte de un organismo uniforme que no está dotado de la facultad de responder con la producción de anticuerpos humorales específicos". HAMILTON (4), al considerar el cambio de sensibilidad de las células a los agentes infecciosos, opina que el mismo va aparejado con la progresiva diferenciación celu-

lar, y que parece probable, por lo tanto, que este cambio sea debido a una diferenciación de las proteínas que son inapropiadas para el desarrollo de los microorganismos o que activamente los combaten formando anticuerpos específicos.

No es fácil interpretar en una forma global los resultados que se obtuvieron. Ello es comprensible, si vemos que las inoculaciones, en su mayoría, se efectuaron en un lapso variable comprendido entre los 4 y 12 días de incubación, durante el cual existen períodos en que los embriones resultan ser más susceptibles a las infecciones, los traumatismos y otros factores extrínsecos e intrínsecos (4) (10).

En saco vitelino, los resultados nos indican la existencia de un proceso de adaptación progresivo del hongo con predominio y abundancia de la fase levaduriforme en última instancia. Estos resultados son comparables a los obtenidos por BRUECK y BUDDINGH (1) cuando inocularon pus de lesiones humanas de esporotricosis en saco vitelino. Sin embargo, los autores no indican la supervivencia lograda.

En membrana corioalantoica, se observa ya a los siete días el establecimiento de la fase levaduriforme o tisular del hongo, notándose un paso progresivo bien definido a partir del inóculo micelial. SALBIN (9) al hablar del *S. schenckii* como uno de los hongos más pleomórficos, reconoció por lo menos cuatro fases de desarrollo en medios especiales in vitro: fase levaduriforme monogemante, fase levaduriforme con gemas múltiples, fase de hifas abortivas y la fase micelial. En la M.C.A. logramos observar los mismos elementos pero en un orden inverso, de tal manera que en los primeros casos se notaron elementos micelianos aún con fructificaciones, luego hifas abortivas, levaduras con gemas múltiples y por último una fase de elementos monogemantes y agemantes. El crecimiento del hongo en este anexo fue localizado y abundante, con escasa tendencia a difundirse a otras regiones. VISCO (10) al notar el mismo hecho en la inoculación de la M.C.A. con *Candida albicans*, aduce que siendo la misma un órgano mesenquimatoso, representaría un obstáculo eficaz a la difusión del hongo. En nuestro caso cabría la misma interpretación.

Las condiciones que ofrece la cavidad alantoica no son propicias para la proliferación del hongo. Estando la misma delimitada por paredes endodérmicas y, conteniendo el líquido alantoico como producto fluido en que se acumulan diversas sustancias, se presenta para el hongo un medio aparentemente desfavorable, al cual responde con predominio de formas levaduriformes. Conforme avanza el período post-inoculatorio la pobreza de los cultivos y de los elementos del hongo en los frotos estudiados, era más evidente. El comprometimiento del saco vitelino es un factor importante en el índice de mortalidad obtenido.

En la cavidad extraembrionaria, los resultados hallados indican una profusa difusión del hongo, lo cual es debido a la especial situación del inóculo. Por esta vía, el hongo encuentra un medio favorable para su prolefiración, mostrándose los embriones muy susceptibles.

Por los resultados obtenidos en los frotos y cultivos, se demuestra que

en el albumen el hongo se localiza en la región inoculada. El albumen, por sus características físicas, impide la difusión del hongo hacia otras regiones, siendo además un medio nutritivamente inadecuado como lo demuestran los resultados hallados en los cultivos y frotos. La mayoría de las formas del hongo dieron una reacción P.A.S. débil, lo cual podría interpretarse como una degeneración en este medio.

La gran susceptibilidad del embrión de pollo a la infección por la vía amniótica, se hizo patente con la muerte de todos los embriones en un período de 24 a 48 horas, lo cual explica también que no se lograra demostrar una diseminación del hongo a los tejidos intrínsecos del embrión. A pesar del corto período post-inoculatorio se observa que el medio amniótico es favorable para el desarrollo de la fase levaduriforme.

En la inoculación intracerebral se puede observar que la susceptibilidad disminuye en embriones de más de 16 días aunque el resultado siempre fue fatal. La inoculación de la fase levaduriforme prolonga un poco más el período de supervivencia.

Por la vía intramuscular la susceptibilidad disminuye con la edad del embrión, lográndose una supervivencia absoluta a los 17 días. La morfología que presenta el hongo en el material muscular, sugiere degeneración de los elementos micelianos que se muestran débilmente P.A.S. positivos. Resultados semejantes se obtuvieron con la fase levaduriforme.

Por la vía endovenosa el alto porcentaje de muertes no guarda relación con las lesiones observadas en los embriones. Por lo tanto, es difícil creer que las muertes sean debidas exclusivamente al proceso infeccioso sobre todo tomando en cuenta la mortalidad alta observada en los testigos. La aplicación de este tipo de inoculación tiene entonces un campo bastante limitado en estudios similares.

La membrana externa de la cáscara, de naturaleza queratínica, no favorece en mucho la proliferación del *S. schenckii*. Los embriones que murieron, probablemente fue debido a condiciones propias de la membrana de la cáscara. El estudio microscópico destaca el pleomorfismo del hongo con elementos débilmente P.A.S. positivos, notándose degeneración especialmente en las formas micelianas y en las conidias.

Nuestra experiencia comprueba algunos caracteres propios del *S. schenckii* como parásito y como organismo típicamente pleomórfico. Así, el hongo conforme se adapta a las diferentes regiones embrionarias, con la progresiva incubación, va adquiriendo una morfología cada vez más regular llegando a predominar en muchos casos, el aspecto levaduriforme, enseudomicelio y las formas de cigarro. El tiempo de supervivencia en algunos casos fue el motivo para que no se llevara a cabo la transformación. Muchas de las formas micelianas que se observaron, es lógico suponer que fuesen porciones del inóculo original, que por sus características daban la impresión de hallarse en vías de degeneración.

En el aspecto patogénico del *S. schenckii* para el embrión de pollo, es posible que la producción de sustancias tóxicas como resultado de la proli-

feración del hongo o de la degeneración del mismo, jueguen un papel muy importante en los resultados logrados. No debemos descartar las características individuales de los embriones y los efectos traumáticos que podrían provocar alguna contradicción en los resultados obtenidos.

## RESUMEN

Se estudian los caracteres de la inoculación experimental del *S. schenckii* en el embrión de pollo, por diez vías diferentes, a saber: saco vitelino, membrana corioalantoica, cavidades alantoica, extraembrionaria y amniótica, saco del albumen, intracerebral, intramuscular, endovenosa y en la membrana de la cáscara (testácea). Para cada una de las inoculaciones se utilizó, en general, lotes de cinco huevos embrionados. De cada región inoculada y de cada embrión en particular, se hace un estudio micológico detallado y un estudio microscópico anatomopatológico, utilizando las técnicas de coloración P.A.S., Gram y hematoxilina eosina.

Se observa que los diferentes tejidos y fluidos del embrión presentan un medio nutricional y ciertas condiciones propias que hacen posible un diferente comportamiento del hongo en ellos. Se comprueba el pleomorfismo del hongo en los tejidos y líquidos embrionarios (micelio vegetativo, micelio reproductor, pseudomicelio, promicelio, blastogénesis con células mono y multigermantes, conidias pequeñas y grandes, elementos redondeados y formas típicamente en naveta o cigarro), y en ningún caso se logra encontrar las formaciones asteroides descritas en otros animales de experimentación.

## SUMMARY

Embryonated cricken eggs were inoculated with *Sporotrichum schenckii* by ten different routes: yolk sac, chorio-allantoic membrane, allantoic, extra-embryonary, and amniotic cavities, albumen sac, brain, muscle, blood vessels, and shell membrane. Five eggs were used in each type of inoculation. Detailed mycological studies and anatomo-pathologic microscopic examination were carried out, using P.A.S., Gram and hematoxylin-eosin techniques.

The fungus behaved differently in the various tissues and fluids of the embryo. Pleomorphism was observed, including vegetative mycelium, reproductive mycelium, pseudomycelium, promycelium, blastospore production with one or several buds, small and large conidia, rounded and cigar-shaped cells. No asteroid formations were found.

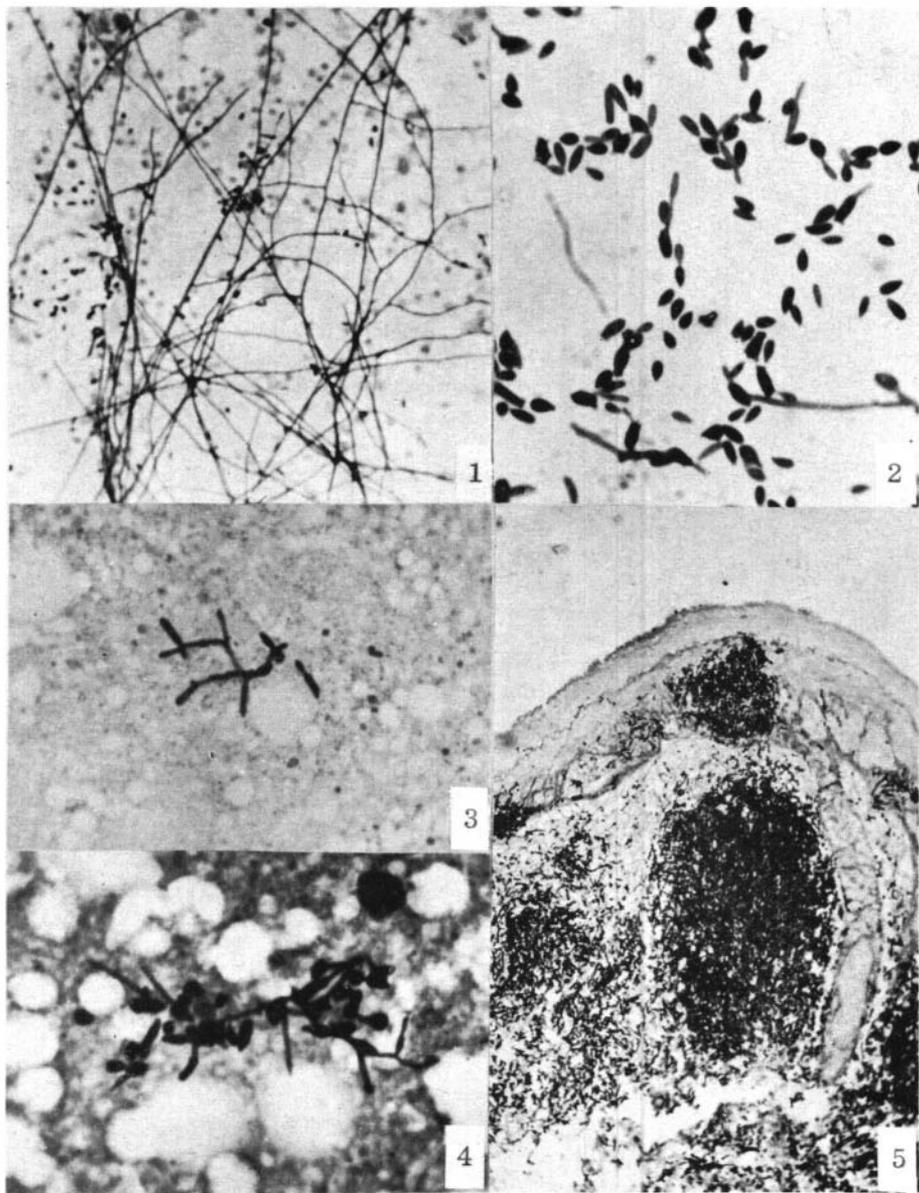
## AGRADECIMIENTO

Expreso mi reconocimiento muy sincero al Profesor Renato Soto P. por los valiosos consejos que me brindó durante la realización de este trabajo. Asimismo, agradezco profundamente al Profesor Rodrigo Zeledón su estimable ayuda en la presentación y revisión del manuscrito.

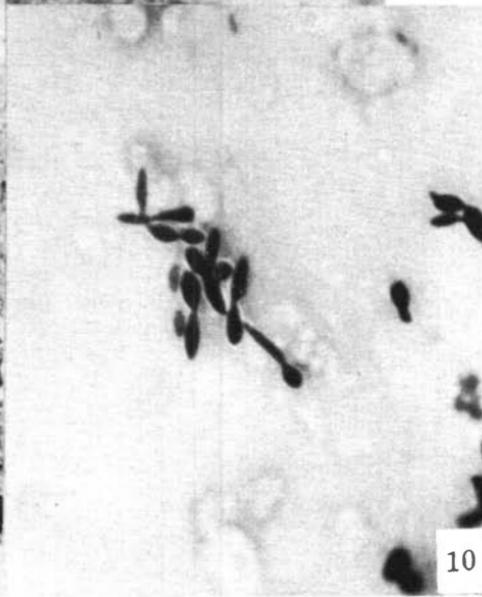
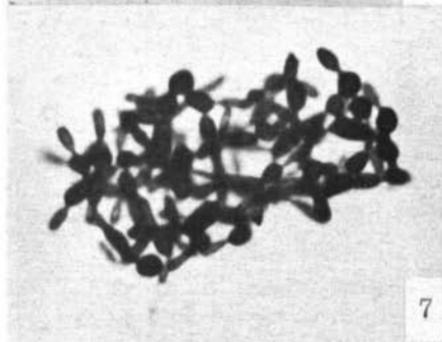
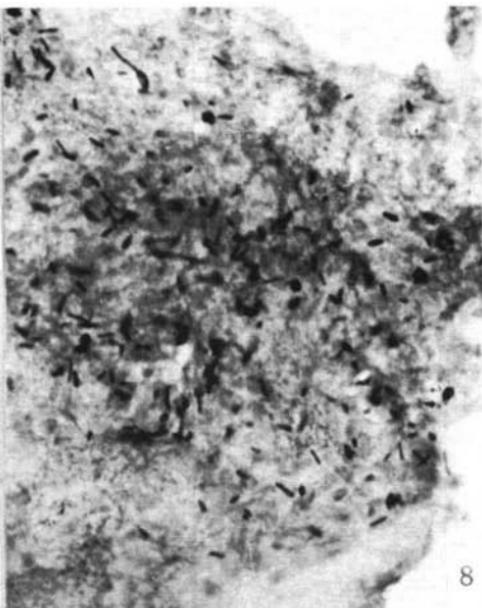
## BIBLIOGRAFIA

1. BRUECK, I. W., & I. BUDDINGH  
1951. Propagation of pathogenic fungi in the yolk sac of embryonated eggs. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 76: 258-261.
2. BUDDINGH, G. J.  
1952. Chick-embryo technics. En Rivers, T. M.: *Viral and Rickettsial infections of man*. II Ed. xvi + 719 pp. J. B. Lippincott Co., Phil.
3. BUDDINGH, G. J.  
1952. Bacterial and mycotic infections of the chick embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55: 282-287.
4. HAMILTON, H. L.  
1952. Sensitive periods during development. En Miner, R. W.: *The chick embryo in biological research*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55: 37-344.
5. LANGERON, M.  
1949. *Précis de microscopie*. 7 ed. viii + 1430 pp. Masson et Cie.
6. LILLIE, R. D.  
1954. *Histopathologic technic, and practical histochemistry*. ix + 501 pp. Blakiston Co., Inc., N. Y.
7. MELLO, R. DE P., L. DE P. MELLO & A. PEREZ  
1955. Identificação de cogumelos patogênicos por meio da coloração ácido periódico-Schiff. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 53: 519-524.
8. MOORE, M.  
1941. The chorio-allantoic membrane of the developing chick as a medium for the cultivation and histopathologic study of pathogenic fungi. *Amer. J. Path.*, 17: 103-125.
9. SALBIN S. B.  
1947. Multiple budding in *Sporotrichum schenckii* Matruchot. *J. Invest. Dermat.*, 9: 315-320.
10. VISCO, G.  
1959. Ricerche sulla candidosi sperimentale dell'embrione di pollo. 1.—Le caratteristiche generali del processo. *Riv. Ist. Sieroter. Italiano*, 24: 29-46.

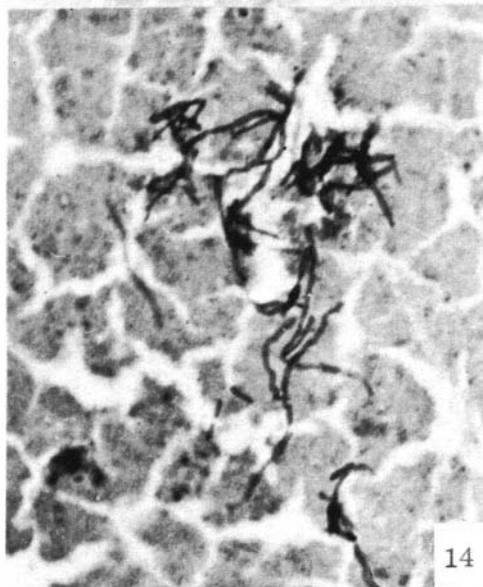
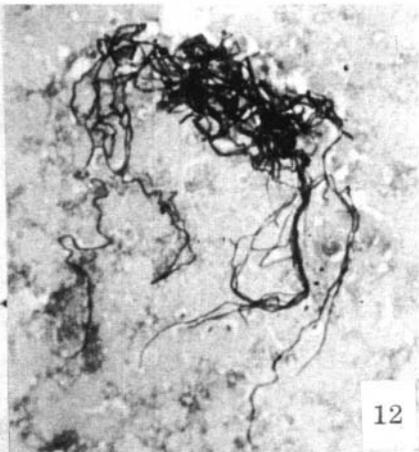
- Fig. 1: Aspecto del inóculo micelial utilizado en nuestras experiencias (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 2: Aspecto del inóculo levaduriforme utilizado en nuestras experiencias (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 3: Saco vitelino (embrión muerto a los 3 días): obsérvese pseudomicelio y blastogénesis (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 4: Saco vitelino (embrión muerto a los 4 días): nótese la presencia de blastogénesis, pseudomicelio y de células multigemantes (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 5: Corte histológico de saco y contenido vitelinos (embrión muerto a los 13 días): se aprecia una profusa invasión del hongo especialmente en el área subyacente al saco vitelino (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).



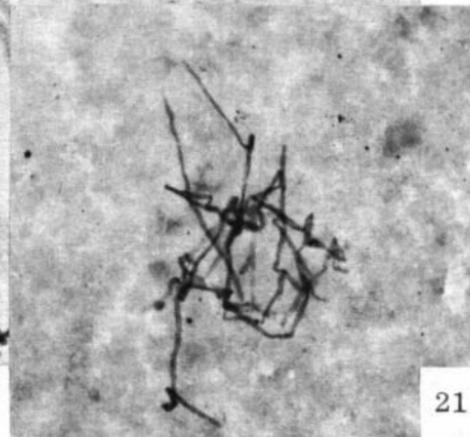
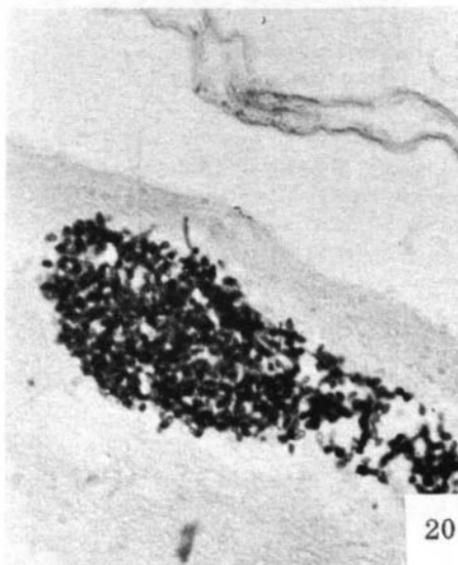
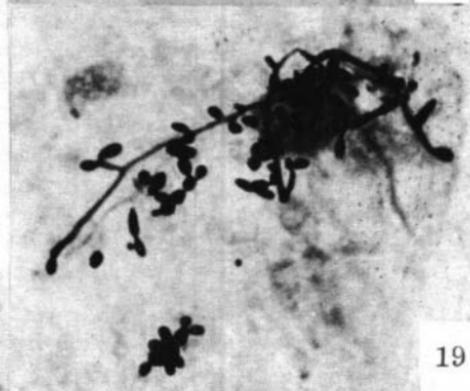
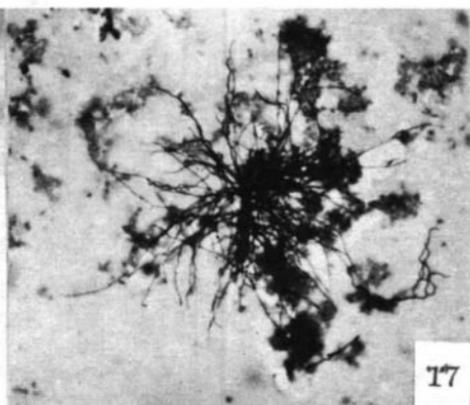
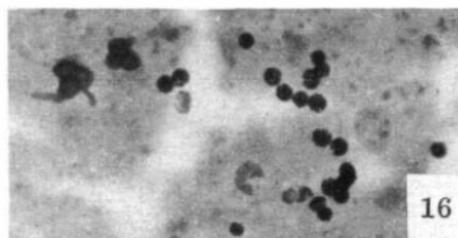
- Fig. 6: Membrana corioalantoica (embrión muerto a los 4 días): se aprecia una blastospora multigemente (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 7: Membrana corioalantoica (embrión muerto a los 5 días): nóteseseudomicelio de células redondeadas y alargadas, algunas multigemantes (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 8: Membrana corioalantoica (embrión muerto a los 7 días): nótese el predominio marcado de las formas en cigarro. También se observa blastogénesis (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 9: Corte de membrana corioalantoica (embrión muerto a los 7 días): se aprecia una profusa invasión de la membrana, especialmente en las regiones coriónica y subcoriónica (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 10: Cavidad alantoica; líquido alantoico (embrión matado intencionalmente a los 5 días): se aprecia blastogénesis, con algunas células multigemantes (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).



- Fig. 11: Cavity extraembrionaria; preparaci3n de la pared externa del anexo alantoico (embri3n muerto a los 4 d3as): se observa un predominio de formas promicelianas y algunos elementos aislados (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 12: Secreci3n extraembrionaria (embri3n muerto a los 6 d3as): obs3rvase micelio vegetativo sinuoso poco teñido en algunas regiones (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 13: Cavity extraembrionaria; membrana amni3tica (embri3n muerto a los 4 d3as): obs3rvase formas t3picamente promicelianas (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 14: Saco del albumen' (embri3n matado intencionalmente a los 8 d3as): obs3rvase el micelio irregular, pleom3rfico, poco coloreado (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 15: Saco del albumen (embri3n muerto a los 14 d3as): obs3rvase las t3picas formas alargadas en cigarro (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).



- Fig. 16: Saco del albumen (embrión nacido a los 23 días): se aprecian elementos cocoides, unos en desintegración, otros con cortas proyecciones a manera de promicelio y algunos con su pared rota (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 17: Cavidad amniótica, membrana amniótica (embrión muerto a las 24 horas): se aprecia micelio bien desarrollado, sinuoso, predominantemente vegetativo (Col. P.A.S., 450).
- Fig. 18: Cavidad amniótica, líquido amniótico (embrión muerto a las 48 horas): se aprecianseudomicelios constituidos por blastosporas redondeadas y restos micelianos poco coloreados (Col. P.A.S., 1000  $\times$ ).
- Fig. 19: Cavidad amniótica, membrana amniótica (embrión muerto a las 48 horas): obsérvese hifas esporógenas con fructificaciones laterales,seudomicelio corto y blastosporas aisladas mono y digemantes (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 20: Intracerebral, corte histológico (embrión muerto a las 38 horas): se observa cúmulo de elementos blastosporados dispuestos a manera de nido (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 21: Intramuscular (embrión muerto a las 72 horas): se aprecia micelio irregular y poco coloreado (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).



- Fig. 22: Intramuscular, corte histológico (embrión muerto a las 72 horas): se observan las hifas cortadas en varias direcciones y la infiltración prevalentemente de células rojas (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 23: Intramuscular, corte histológico (embrión muerto a las 48 horas): se observan los elementos blastosporados entre las fibras musculares (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 24: Membrana de la cáscara (preparación hecha a los 7 días después de inoculado un embrión de 10 días): se nota el predominio de formas redondeadas pequeñas y grandes, algunas poco coloreadas y, algunos restos micelianos también poco teñidos (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 25: Membrana de la cáscara (de igual procedencia que la anterior): nótese el micelio poco teñido e irregular y las escasas formas aisladas (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).
- Fig. 26: Membrana de la cáscara, corte histológico (embrión de 4 días muerto a las 48 horas): obsérvese sobre la membrana de la cáscara la gran cantidad de los elementos del hongo, con prevalencia de trozos micelianos irregulares y formas aisladas (Col. P.A.S., 450  $\times$ ).

