

Estudio de la presencia de *Histoplasma capsulatum* en la tierra de 4 cuevas localizadas en la región de Río Claro (Antioquia)*

LUZ HELENA MONCADA, FABIO PINEDA,
JAVIER MUÑOZ, GLORIA FERREIRA

Se estudiaron 50 muestras de tierra de cuatro cuevas de la región de Río Claro (Antioquia, Colombia), con el fin de aislar *Histoplasma capsulatum* en su forma natural; se encontraron dos muestras positivas (4%) tomadas en sitios diferentes de la Cueva del Cóndor. Se describen los métodos empleados y se discuten algunas implicaciones de la presencia del hongo para las personas que visitan las cuevas.

PALABRAS CLAVES

HISTOPLASMA CAPSULATUM

HISTOPLASMOSIS

INFECCION POR INHALACION

CUEVAS

GUACHAROS (*STREATORNIS CARIPENSIS*)

INTRODUCCION

* Distinguido con el premio al mejor trabajo en la modalidad de Ciencias Básicas Médicas en el XXIII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Santa Marta, Octubre 22 de 1988

El *Histoplasma capsulatum*, agente causal de la histoplasmosis, fue aislado por primera vez a partir del suelo por Emmons en 1949 (1); desde entonces muchos otros investigadores, en diferentes lugares del mundo, han informado su presencia en el suelo de cuevas y de otros sitios frecuentados por aves y murciélagos, lo mismo que la ocurrencia de epidemias en personas y animales expuestos a la inhalación de las conidias presentes en el suelo contaminado (2-24). Se ha descrito también la infección natural en animales, principalmente en diferentes especies de murciélagos así como en gatos y perros (3, 4, 25-28). En este estudio se analizaron muestras de tierra de cuatro cuevas de la región de Río Claro (Antioquia, Colombia) con el

LIC. LUZ HELENA MONCADA, Profesora, Sección de Microbiología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. MAG. EN MICROBIOLOGIA FABIO PINEDA Y MASTER EN SISTEMATICA ANIMAL JAVIER MUÑOZ, Profesores, Departamento de Biología, Facul-

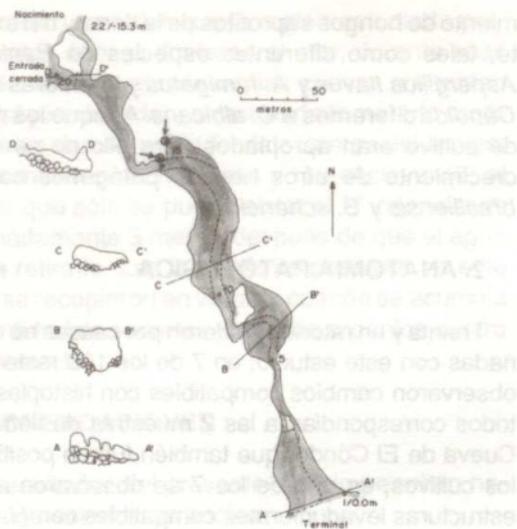


Fig. N° 3 Cueva del Cóndor

● SITIOS DE TOMA DE MUESTRAS

Cueva de El Cóndor (Figura N° 3)

Se encuentra en la parte norte de la región. Está formada por un túnel de 488 metros de largo, atravesado en toda su extensión por una corriente de agua que, en épocas de invierno, puede subir hasta más o menos 5 metros de altura, arrastrando el sustrato orgánico del interior. Consta de una serie de salones de 30 mts. de altura por 20 mts. de ancho habitados por numerosos guácharos y murciélagos (*Carollia perspillata*, *Artibeus vamaicensis*, *Glossophasa soricina* y *Trachops cirrhosus*). El suelo se encuentra tapizado por material orgánico que incluye maderas, semillas y heces de murciélagos y guácharos formando un piso duro, apto para la supervivencia de microorganismos, insectos, sapos, babosas y algunas plantas.

La temperatura de la cueva es de 24 a 27°C y la del agua dentro de la misma de 23 a 25°C. En esta cueva se tomaron 20 muestras.

Cueva de los Guácharos

Está ubicada al este de la región; tiene una longitud de 442 mts. con una entrada de 10 a 15 mts. de alto por 2 a 3 mts. de ancho; la recorre una corriente de agua que en algunos lugares forma charcos que imposibilitan su recorrido y exploración. En su interior

se hallan varios salones habitados por murciélagos y guácharos; la composición del suelo es similar a la de la Cueva de El Cóndor. En esta cueva se obtuvieron 10 muestras.

Cueva de La Danta

Está localizada al norte de la zona y es una de las más largas; la corriente que la atraviesa forma charcos, a veces profundos, que imposibilitan el tránsito, por lo cual hay que recurrir a pasos alternos. Tiene varios pisos cada uno con salones. El suelo es muy húmedo, con abundante materia orgánica, de composición similar a la arriba descrita. En esta cueva se tomaron 10 muestras.

Cueva de El Templo del Tiempo

Está situada al este de la región, a la izquierda del cañón del Río Claro; en su interior hay pasajes erosionados, con estalactitas, y se encuentra habitada por murciélagos cuyas heces se mezclan con el piso que es duro y seco. Es un paso obligado para los turistas que visitan el refugio ecológico. En ella se tomaron 10 muestras.

2. TOMA DE LAS MUESTRAS

Para evitar la contaminación en las cuevas los investigadores utilizaban mascarilla, botas y ropa adecuada. En el interior seleccionaban 5 sitios diferentes en un metro cuadrado de tierra y recogían, con cucharas estériles, aproximadamente 100 a 150 gm. de tierra húmeda, mezclada con excretas viejas de guácharos y murciélagos (34); se tenía cuidado de no disturbarla, empezando desde la superficie hasta una profundidad aproximada de 10 cm; se depositaban las muestras en frascos estériles de boca ancha con tapa de rosca que se rotulaban con el nombre de la cueva, la fecha y el número de la muestra y se transportaban al laboratorio para su proceso rápido.

3. PROCESO DE LAS MUESTRAS

Para demostrar la presencia del *H. capsulatum* se empleó la inoculación intraperitoneal en ratones de 2 a 6 meses de edad, de la tierra previamente descontaminada; se siguieron las recomendaciones de otros investigadores (10,18,21) con algunas modificaciones en la concentración de los antibióticos. Se emplearon ratones albinos (*Mus musculus*).

Seis a ocho semanas después de la inoculación se sacrificaban los ratones y se les extraían el bazo, el hígado y los pulmones. Cada uno de estos órganos se dividía en dos porciones para los estudios histológico y microbiológico respectivamente. La porción destinada para los cultivos se dividía finamente con un bisturí estéril y se sembraba en cajas de petri que contenían un medio neutro compuesto de 10 gm. de neopeptona, 10 gm. de dextrosa y 20 gm. de agar, disueltos en un litro de agua destilada. Para inhibir el crecimiento bacteriano el medio contenía cloranfenicol (0.05 mg/ml), penicilina (20 U/ml) y estreptomina 40 mg/ml; también se utilizaba el agar infusión de cerebro y corazón (BHI) al 2% (pH 7.4), adicionado de actidiona (0.5 mg/ml) y cloranfenicol (0.5 mg/ml) (35), con el fin de inhibir los mohos saprofitos y las bacterias. La siembra en cajas tenía por objeto incrementar las posibilidades de aislamiento al ser mayor el espacio disponible. Los cultivos se incubaban durante 4 semanas entre 22 y 24°C y se hacía lectura semanal.

De las colonias sospechosas se preparaban placas con azul de lactofenol para identificar las estructuras que permiten la clasificación del hongo. Cuando se observaban macroconidias tuberculadas, la colonia se repicaba en agar BHI al 2% en tubos, a 37°C, para obtener la fase levaduriforme, confirmando así el cultivo como *Histoplasma capsulatum*.

3. ANATOMIA PATOLOGICA

Las porciones de órganos destinadas al estudio histopatológico se procesaban por técnicas estándar y los cortes se sometían a la coloración combinada de Hematoxilina-Eosina Plata-Metenamina (39) por su ventaja de permitir la observación simultánea de la reacción tisular y de las estructuras micóticas.

RESULTADOS

1. CULTIVOS

Dos de las 50 muestras (4%) de tierra, obtenidas en sitios diferentes de la cueva de El Cóndor, fueron positivas para *H. capsulatum* (Figura N° 3); tales sitios son paso obligado de las personas que visitan la cueva. En algunas muestras se observó el creci-

miento de hongos saprofitos de la tierra y del ambiente, tales como diferentes especies de *Penicillium*, *Aspergillus flavus* y *A. fumigatus* y levaduras de tipo *Cándida* diferentes a *C. albicans*. Aunque los medios de cultivo eran apropiados para ello no se obtuvo crecimiento de otros hongos patógenos como *P. brasiliensis* y *S. schenckii*.

2. ANATOMIA PATOLOGICA

Treinta y un ratones murieron por causas no relacionadas con este estudio; en 7 de los 169 restantes se observaron cambios compatibles con histoplasmosis; todos correspondían a las 2 muestras de tierra de la Cueva de El Cóndor que también fueron positivas en los cultivos; en uno de los 7 se observaron algunas estructuras levaduriformes compatibles con *H. capsulatum* en los macrófagos de la pulpa roja del bazo, en las células de Kupffer del hígado y en los macrófagos alveolares del pulmón; en los otros seis se observaron en los tres órganos cambios muy sugestivos de histoplasmosis, especialmente en las células de Kupffer. En todos los casos hubo ausencia de reacción inflamatoria, hallazgo previamente descrito (40).

DISCUSION

El aislamiento de *H. capsulatum* solamente en el 4% de las muestras se puede explicar por varias circunstancias previamente descritas que influyen en la positividad de los cultivos de tierras, a saber: la cantidad de tierra, el número de muestras de cada cueva, el número de unidades infectantes presentes en una determinada muestra y la competencia de otros microorganismos presentes en ella. Se ha comprobado que hay mucha diferencia, aún entre sitios muy cercanos, en la concentración de unidades infectantes necesaria para obtener un cultivo positivo; ello permite pensar en la influencia de diversos factores propios de la ecología del *H. capsulatum* (34) que pueden dificultar su aislamiento.

Según las recomendaciones de Ajello (35) se deben estudiar 25 muestras de tierra por cueva para tener mayor probabilidad de aislamiento. Por inconvenientes de diversa índole sólo nos fue posible estudiar un número más limitado de muestras; nuestros resultados permiten plantear la conveniencia, en trabajos futuros, de concentrar todos los recursos en el estudio de una sola cueva.

Es preciso recordar que la región estudiada presenta varias épocas lluviosas al año; durante ellas las corrientes que atraviesan las cuevas aumentan su caudal y las inundan, arrastrando la materia orgánica que es rica en unidades infectantes del hongo; así lo demostraron Shacklette y Hasenclever (5) al observar que sólo se puede aislar el *H. capsulatum* aproximadamente 3 meses después de que el agua se haya retirado. Las 2 muestras positivas en este estudio se recogieron en verano, cuando se acumula gran cantidad de excretas y materia orgánica dentro de las cuevas.

RECOMENDACIONES

Los resultados del presente trabajo permiten hacer las siguientes sugerencias:

1. Informar la posibilidad de contaminación a la comunidad en general y a los guías turísticos e investigadores que trabajan en la región y frecuentan estas cuevas; para ello podrían colocarse vallas ilustrativas al respecto.

2. Alertar al personal de salud de la zona sobre la posible aparición de casos de histoplasmosis.

3. Recomendar a los guías turísticos de la región el uso de mascarillas, botas y ropa apropiada para entrar a visitar las cuevas así como la conveniencia de no perturbar el ambiente cuando se está dentro de ellas.

4. Prohibir la entrada a las cuevas en caso de presentarse alguna epidemia.

5. Continuar las investigaciones mediante el estudio de un mayor número de muestras por cueva, para aumentar la posibilidad de aislar el hongo. Para tales trabajos tener en cuenta los factores climatológicos que influyen en su desarrollo y en las posibilidades de positividad; igualmente los riesgos de contagio para los investigadores.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Libero Ajello, Director de la División de Enfermedades Micóticas del *Center for Disease Control*, Atlanta, EE.UU. por la asesoría para la realización del proyecto. Al Dr. Humberto Hernández, Profesor de la Sección de Neumología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, por la revisión del proyecto. A la Licenciada María Inés Arbeláez y a los Biólogos

Fanny Castilblanco e Ignacio Villa por la colaboración técnica. Al Sr. Juan Guillermo Garcés, por facilitarnos la realización de parte del estudio en algunas de sus propiedades.

SUMMARY

ISOLATION OF *HISTOPLASMA CAPSULATUM* FROM SOIL SAMPLES OF FOUR CAVES FROM RIO CLARO REGION, DEPARTMENT OF ANTIOQUIA, COLOMBIA

Fifty soil specimens from 4 caves located in the Rio Claro region of the Department of Antioquia, Colombia, were studied in order to recover *Histoplasma capsulatum* in its natural form. Two of the specimens, obtained from different sites of one of the caves, were positive. The methods employed for cultivation are described and the implications of the presence of the fungus for tourists visiting the caves are discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. EMMONS CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Hlth Rep* 1949; 64: 892-896.
2. AJELLO L, MANSON-BAHR PEC, MOORE JC. Amboni caves, Tanganyka, a new endemic area for *Histoplasma capsulatum*. *Am J Trop Med Hyg* 1960; 9: 633-638.
3. AJELLO L, GREENHALL AM, MOORE JC. Occurrence of *Histoplasma capsulatum* on the Island of Trinidad, B.W.I. II. Survey of Chiropteran habitats. *Am J Trop Med Hyg* 1962; 11: 249-254.
4. DIERCKS F H, SHACKLETTE MH, KELLEY HB, et al. Naturally occurring histoplasmosis among 935 bats collected in Panama and the Canal Zone, July 1961-February 1963. *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14: 1069-1072.
5. SHACKLETTE MH, HASENCLEVER HF. The natural occurrence of *Histoplasma capsulatum* in a cave. 3. Effect of flooding. *Am J Epidemiol* 1968; 88: 210-214.
6. FOND D'ESCOUBET E, MACOLA S, CHANG PUGA M. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del medio en Cuba. *Rev Cub Med Trop* 1975; 27: 115-127.
7. ANONIMO. Histoplasmosis en Jamaica. *Carec., Surveillance Report* 1978; 4: 1-3.
8. QUIÑONES F, KOPLAN JP, PIKE L, et al. Histoplasmosis in Belize, Central America. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 558-561.
9. CASTAÑEDA E, CADENA A, AGUILERA A, et al. Histoplasmosis epidémica. II. Hallazgos en la Cueva del Edén (Cunday, Tolima). *Biomédica* 1981; 1: 208-212.

10. BARTLETT P C, WEEKS R J, AJELLO L. Decontamination of a *Histoplasma capsulatum* infested bird roost in Illinois. *Arch Environm Hlth* 1982; 37: 221-223.
11. JACKSON D. Histoplasmosis. A "Spelunker's" risk. *Am Rev Resp Dis* 1961; 83: 261-263.
12. D'ALESSIO D J, HEEREN R H, HENDRICKS S L, et al. A starling roost as the source of urban epidemic histoplasmosis in an area of low incidence. *Am Rev Resp Dis* 1965; 92: 725-731.
13. TOSH F E, DOTO I L, D'ALESSIO D J, et al. The second of two epidemics of histoplasmosis resulting from work on the same starling roost. *Am Rev Resp Dis* 1966; 94: 406-413.
14. LARRABEE W F, AJELLO L, KAUFMAN L. An epidemic of histoplasmosis on the Isthmus of Panama. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 281-285.
15. DEAN A G, BATES J, SORREL C, et al. An outbreak of histoplasmosis at an Arkansas courthouse, with five cases of probable reinfection. *Am J Epidemiol* 1978; 108: 36-46.
16. WARD J, WEEKS M, ALLEN D, et al. Acute histoplasmosis: clinical, epidemiologic and serological findings of an outbreak associated with exposure to a fallen tree. *Am J Med* 1979; 66: 587-595.
17. LOTTENBERG R, WALDMAN R H, AJELLO L, et al. Pulmonary histoplasmosis associated with exploration of a bat cave. *Am J Epidemiol* 1979; 110: 156-161.
18. STORCH G, BURFORD J, GEORGE R B, et al. Acute histoplasmosis: description of an outbreak in Northern Louisiana. *Chest* 1980; 77: 38-42.
19. LATHAM R H, KAISER A B, DUPONT W D, DAN B B. Chronic pulmonary histoplasmosis following the excavation of a bird roost. *Am J Med* 1980; 68: 504-508.
20. CASTAÑEDA E, COPPIANO C I, RAAD J, et al. Brote epidémico de histoplasmosis asociado con exposición a un árbol hueco. *Acta Med Col* 1983; 8: 17-22.
21. WALDMAN R J, ENGLAND A C, TAUXE R, et al. A winter outbreak of acute histoplasmosis in Northern Michigan. *Am J Epidemiol* 1983; 117: 68-75.
22. GALINDO R C, MENDIVIL-SALGADO N E. Brote epidémico de histoplasmosis pulmonar primaria en un grupo de Boy Scouts. Zongólica, Veracruz. *Epidemiología (México)* 1984; 4: 222-256.
23. DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS MEDICOS DE LA U.N.A.M. Depto. de Medicina Preventiva. Brote de Histoplasmosis en estudiantes. Apaxtla, Gro. *Epidemiología (México)* 1984; 4: 260-264.
24. SACKS J J, AJELLO L, CROCKETT L K. An outbreak and review of cave associated histoplasmosis capsulati. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 313-327.
25. MARINKELLE C J, GROSE E. *Histoplasma capsulatum* from the liver of a bat in Colombia. *Science* 1965; 147: 1339-1340.
26. ————. Importancia de los murciélagos para la Salud Pública con especial referencia a las micosis zoonóticas. *Ant Med* 1966; 16: 179-193.
27. KABLI S, KOSCHMANN J R, ROBERTSTAD G W, et al. Endemic canine and feline histoplasmosis in El Paso, Texas. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 41-50.
28. SILVA-RIBEIRO U L, FERREIRA DA CRUZ M F, WANKE B. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: natural and experimental infection. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 319-322.
29. ESPINAL L S. Geografía ecológica del Departamento de Antioquia. Zonas de vida (formaciones vegetales) del Departamento de Antioquia. *Rev Fac Nat Agron Medellín* 1985; 38: 5-106.
30. INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI. Diccionario Geográfico de Colombia. 1980; 420 pp. Bogotá.
31. RENTERIA E. Estudio botánico de la región de San Luis. Informe final. 1a. etapa. Colciencias, 1985; 86 pp.
32. INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI. Diccionario Geográfico de Colombia. 1982; 2 v. Bogotá.
33. INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI. Diccionario Geográfico de Colombia. 1972; 2 v. Bogotá.
34. LARSH W H. The epidemiology of histoplasmosis. En: AL-DODRY Y. ed. The epidemiology of human mycotic diseases. Springfield: Thomas, 1975: 52-73.
35. AJELLO L, GEORG L, KAPLAN W, KAUFMAN L. Laboratory manual for medical mycology. USA. Depart. Hlth. Educt. Welf., Public Hlth. Serv. Comm. Dis. Cent., Atlanta. GA. Public Hlth Serv. 1963 publicat. No. 994: 23.
36. VELEZ H, DIAZ F. Onycomycosis due to saprophytic fungi. *Mycopathol* 1985; 91: 87-92.
37. VELEZ H. Onicomycosis por hongos saprofitos. Informe de 49 casos. *IATREIA* 1988; 1: 91-97.
38. ANDREWS C, PEREIRA H, WILDY P. Viruses of Vertebrates. 4a. ed. London: Bailliere Tindall, 1978: 421 pp.
39. CHANDLER F W, KAPLAN W, AJELLO L. Color atlas and text of the histopathology of mycotic diseases. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1980: pag. 19.
40. RANDHAWA H S, CHATURVEDI V P, KINI S. KHAN Z U. *Blastomyces dermatitidis* in bats: first report of its isolation from liver of *Rhinopoma hardwickei* Gray. *J Med Vet Mycol* 1985; 23: 69-76.