



**Universidad Nacional del Nordeste**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Maestría en Micología Médica**

**¿Bahía Blanca zona endémica para *Histoplasma capsulatum*?**

**Investigación presentada para obtener el título de**

**Magister en Micología Médica**

**Dina Pedersen**

**Directora del trabajo de tesis**

**Dra Alicia Arechavala**

**Co-Director**

**Mg Carlos Fiore**

Marzo 2016

## DEDICATORIA

A mis padres Elsa y Ernesto, por las motivaciones y oportunidades.

A Gustavo, por su apoyo incondicional y paciencia.

A mis hijos Enzo y Emmy, por esperarme con una sonrisa.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincera gratitud a todos los que me inspiraron con su amor por la Micología y su interés por llegar a un diagnóstico certero, a los que me guiaron y acompañaron en el aprendizaje, y a todos aquellos que han colaborado para que pudiese finalizar este trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Alicia Arechavala por dirigirme en este trabajo; gracias por su guía constante, su paciencia, su disposición y su generosidad al enseñar.

Mi reconocimiento al Profesor Dr. Ricardo Negroni por sus inolvidables clases llenas de detalles memoriosos, gracias por compartir con tanta pasión sus experiencias clínicas y sus conocimientos, ha sido realmente un placer.

También quiero agradecer a todos los docentes de la Maestría en Micología Médica, han sido más que generosos con sus alumnos y hemos disfrutado de cada clase.

A Gustavo Giusiano, Gabriela Santiso, Roxana Depardo, Mario Bianchi, Emmanuel Marín, José Díaz y a todo el personal de la Unidad de Micología del Hospital Muñiz. Gracias a todos por recibirnos con una sonrisa en cada encuentro, cuando los invadíamos con preguntas e inquietudes.

A mis compañeros de Maestría, Cecilia Madeo, Fernando Mesina, Mariel Carballo, Mercedes Romero, Liliana Merino, Karina Ardizolli, Mariela Merck y Adela Ampuero, gracias por la compañía y el apoyo a la distancia.

A Marta del Valle ex Jefa del Laboratorio del Hospital Municipal de Agudos de Bahía Blanca, al Mg Carlos Fiore y a las autoridades del Departamento de Docencia e Investigación por permitirme realizar este trabajo .

A mis compañeros del Laboratorio del Hospital Municipal de Agudos de Bahía Blanca que me han acompañado en este proyecto; especialmente a Silvana Conte y Daniela Zabala que me ayudaron con las intradermorreacciones, gracias por la ayuda desinteresada y la buena disposición.

A Guillermo Lemus profesional a cargo del Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur; sin su ayuda el trabajo con animales hubiese sido imposible.

A la Dra Graciela Gigola docente de la Cátedra de Anatómo-Histología Humana que muy amablemente procesó los tejidos y realizó los cortes histológicos, mi sincero agradecimiento.

A mis compañeros de la Cátedra de Bacteriología y Micología; Marcelo Occhionero, Laura Paniccia, Gabriela Rossi y Gabriela Sica, gracias por sus opiniones y sus aportes críticos.

Al Servicio de Patología del Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero, gracias por haber contribuido con mi trabajo.

A todos, sepan que guardo una profunda gratitud por toda la colaboración brindada.

Muchas gracias!

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	5
1.1 Sinonimia	5
1.2 Definición	5
1.3 Historia de la enfermedad	5
1.4 Agente etiológico	7
1.5 Ecología	13
1.6 Epidemiología	14
1.7 Patogenia	16
1.8 Manifestaciones clínicas	20
1.9 Diagnóstico micológico	31
1.10 Prueba intradérmica con histoplasmina	41
1.11 Antifúngicos y tratamiento	42
1.12 Histoplasmosis en Argentina	43
1.13 Histoplasmosis en Bahía Blanca	44
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	46
<b>3. HIPÓTESIS</b>	48
<b>4. OBJETIVOS</b>	49
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	50
5.1 Búsqueda de <i>H. capsulatum</i> en reservorios ambientales	50
5.2 Encuesta epidemiológica con histoplasmina	53
5.3 Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> a partir de muestras clínicas	55

<b>6 RESULTADOS</b>	59
6.1 Búsqueda de <i>H. capsulatum</i> en reservorios ambientales	59
6.2 Encuesta epidemiológica con histoplasmina	65
6.3 Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> a partir de muestras clínicas	69
<b>7 DISCUSIÓN</b>	78
7.1 Búsqueda de <i>H. capsulatum</i> en reservorios ambientales	78
7.2 Encuesta epidemiológica con histoplasmina	79
7.3 Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> a partir de muestras clínicas	81
<b>8 CONCLUSIONES</b>	82
<b>9 BIBLIOGRAFIA</b>	83
<b>10 ANEXOS</b>	94

## RESUMEN

La histoplasmosis se define como la infección causada por el hongo dimorfo *H. capsulatum*. Es una micosis de gravedad variable que afecta pulmones, tejidos linfáticos, hígado, bazo, piel, mucosas, sistema nervioso central y otros órganos. La infección se inicia después de la inhalación de las partículas infectantes del hongo y a partir de ese momento pueden aparecer diversas manifestaciones clínicas. El curso de la infección y la forma clínica de presentación depende entre otras cosas del tamaño del inóculo y del estado inmune del paciente.

Es considerada la micosis más importante del continente americano y en Argentina es la micosis endémica más frecuente. En nuestro país las tasas de infección son variables dependiendo de la localización geográfica; siendo de aproximadamente un 30% en las regiones lindantes al Río de La Plata y de hasta 73% en el noreste de Córdoba.

El diagnóstico de laboratorio de histoplasmosis no es simple y debe abordarse teniendo en cuenta criterios clínicos y epidemiológicos. Según la forma clínica de presentación se pueden realizar: exámenes directos, cultivos en medios adecuados, coloraciones específicas, detección de antígenos y anticuerpos, e intradermorreacciones.

La presente investigación se realizó en la ciudad de Bahía Blanca en el período comprendido entre mayo de 2013 y junio de 2015. El propósito consistió en la evaluación de la localidad como posible área endémica de histoplasmosis.

Para ello fue necesario la búsqueda, aislamiento e identificación de *H. capsulatum* a partir de fuentes ambientales; el conocimiento de las tasas de infección en la ciudad a través de encuestas epidemiológicas con histoplasmina; y el aislamiento del hongo a partir de casos autóctonos de histoplasmosis.

Metodológicamente se abordó este trabajo desde un tipo de estudio descriptivo, observacional de corte transversal.

Los datos obtenidos arrojaron que el 13,9% de la población estudiada tiene una intradermorreacción positiva a la histoplasmina. Por otra parte, se identificó un posible caso de histoplasmosis autóctona; y no se pudo aislar *H. capsulatum* en los reservorios investigados.

La información obtenida no es suficiente para afirmar que Bahía Blanca es zona endémica para *H. capsulatum*. Se propone continuar con la investigación en el tema, ampliando los reservorios ambientales estudiados e incorporando el estudio de infección por *H. capsulatum* en animales domésticos.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1. 1. Sinonimia**

La histoplasmosis ha recibido diferentes denominaciones a través del tiempo y en diferentes regiones geográficas, tales como: enfermedad de Darling, reticuloendoteliosis, citomicosis reticuloendotelial, enfermedad de las cuevas, enfermedad de los murciélagos, enfermedad del Valle de Ohio, fiebre de Tingo María, fiebre de las minas abandonadas, histoplasmosis americana , histoplasmosis clásica e histoplasmosis africana.<sup>1</sup>

### **1.2. Definición**

La **histoplasmosis** es una infección micótica granulomatosa sistémica, causada por un hongo dimorfo denominado ***Histoplasma capsulatum***, que afecta a los seres humanos y a muchos otros mamíferos. La infección se adquiere por inhalación de los microconidios que se encuentran en el suelo, iniciándose regularmente a nivel pulmonar y posteriormente con la probabilidad de diseminarse a diferentes órganos. Las presentaciones clínicas varían desde infecciones asintomáticas, infecciones pulmonares primarias, hasta las formas diseminadas agudas o crónicas, y más raramente las infecciones cutáneas.<sup>2</sup>

### **1.3. Historia de la enfermedad**

Desde la antigüedad se ha sugerido la existencia de la histoplasmosis sobre la base de descripciones de su patogenia e incluso se ha planteado que la causa de la muerte de los miembros de la expedición de Lord Carnarvon (año 1922) a la tumba de Tutankamón fue a causa de una inhalación masiva de conidios de *H. capsulatum* y no la maldición de los “antiguos espíritus egipcios”<sup>3</sup>. Se puede afirmar que la historia de la histoplasmosis comienza a principios del siglo pasado (diciembre de 1905) durante la construcción del Canal de Panamá con los importantes hallazgos realizados por Samuel Darling, médico patólogo norteamericano. Darling se encontraba

realizando la necropsia de un hombre de 27 años, oriundo de Martinica cuya muerte se atribuyó en principio a una tuberculosis miliar. Le llamó la atención la hepatoesplenomegalia y el daño pulmonar, signos similares a los de la leishmaniasis sistémica. En los cortes y biopsias encontró numerosos cuerpos intracelulares semejantes a los amastigotes. La diferencia que notó fue la falta de los kinetonúcleos y que la célula estaba rodeada por un halo transparente semejante a una cápsula. Darling describió al microorganismo como un “parásito de forma ovoide a redonda, rodeado de un halo claro que no se colorea, con un grosor de aproximadamente 1/6 del diámetro del parásito”. Debido al parecido con *Leishmania* pensó que se trataba de un protozoo y que el halo era una cápsula por lo que lo denominó ***Histoplasma capsulatum***.<sup>4</sup>

Ni era un protozoo, ni poseía realmente una cápsula, pero el nombre ha perdurado hasta hoy. No fue sino hasta 1912, después de revisar muestras tisulares y compararlas con un caso de linfangitis epizootica, cuando da Rocha-Lima sugirió que el microorganismo se asemejaba más a una levadura que a un protozoo.<sup>5</sup>

Poco más de 20 años después, el microorganismo se aisló al fin en un medio artificial y se observó que crecía como moho a temperatura ambiente y como una levadura a 37 °C.<sup>6</sup>

En la década de los 30 la existencia de un lactante con histoplasmosis diseminada con respuesta cutánea a un reactivo elaborado a partir de la fase micelial del microorganismo, motivó la realización de pruebas cutáneas a gran escala. Ésto produjo el sorprendente descubrimiento de que la histoplasmosis tenía alta prevalencia en los valles de los ríos Ohio y Mississippi<sup>7</sup>. Además, se determinó que muchos casos de tuberculosis cuyo diagnóstico se basaba en la presencia de nódulos calcificados en las radiografías de tórax, en realidad eran casos de histoplasmosis.<sup>8,9</sup>

#### 1.4. Agente etiológico

El agente etiológico de la histoplasmosis es el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum*. El estado teleomorfo de esta especie fue descrito por primera vez en 1972, como un ascomiceto micelial denominado *Emmonsia capsulata*.<sup>10</sup>

Su ubicación taxonómica actual se muestra en la Tabla 1.

Existen dos variedades de *H. capsulatum* patógenas para el humano: *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* que produce la forma clásica de histoplasmosis e *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* que solo se presenta en África, y es responsable de la histoplasmosis africana.<sup>11,12</sup>

*Histoplasma farciminosum* es el agente causal de la linfangitis epizoótica de los equinos.<sup>13</sup>

*H. capsulatum* var. *capsulatum* es una especie genéticamente heterogénea. Los primeros estudios realizados sobre los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ácido desoxirribonucleico (ADN) de las mitocondrias y de los ribosomas, y los genes nucleares *yps-3* (gen específico de la fase de levadura); permitieron clasificar al microorganismo en seis subespecies o clados que se correlacionan con la distribución geográfica y la virulencia.<sup>14</sup>

Las diferencias genéticas pueden asociarse con manifestaciones clínicas variadas. Se postula que las cepas de *H. capsulatum* de ciertas regiones de Sudamérica, que pertenecen a los clados 5 o 6 suelen producir lesiones cutáneas, pero no así los del clado 2 de Norteamérica según Keath et al.<sup>14</sup> Esto sugiere una gran diversidad genética de *H. capsulatum*, cuya base puede ser que el hongo sufre una recombinación sexual en la naturaleza, lo que le permite el intercambio de material genético.<sup>15</sup>

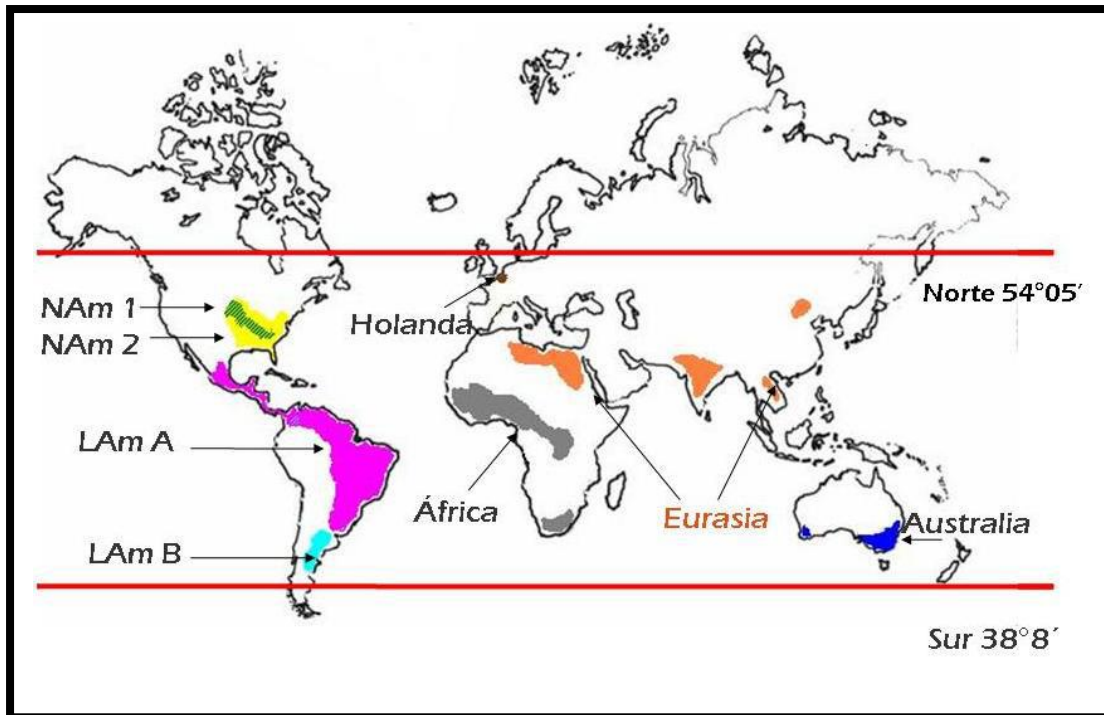
En la actualidad, *H. capsulatum* se considera una especie críptica y comprende un complejo de especies. Kasuga et al.<sup>16</sup> en 2003 realizó un estudio filogeográfico con 137 aislados de *H. capsulatum* procedentes de 25 países en el cual incluyó las tres variedades taxonómicas (la mayoría fueron aislados clínicos de la variedad

*capsulatum*). Con base en las secuencias parciales de cuatro genes, factor de ribosilación del ADP (*arf*), precursor del antígeno H (*H-anti*), desaturasa  $\Delta$ -9 de ácido graso (*ole1*) y  $\alpha$ -tubulina (*tub1*), estos autores han propuesto una clasificación filogenética de la especie *H. capsulatum* que incluye ocho clados (poblaciones genéticas): Norteamérica clase 1 (NAm 1); Norteamérica clase 2 (NAm 2); Latinoamérica grupo A (LAm A); Latinoamérica grupo B (LAm B); Australiano; Holandés; Eurasiano; y Africano. De los ocho clados, siete representan especies filogenéticas, con excepción del clado Eurasiano. La Figura 1 muestra la distribución geográfica de los clados.

Taylor *et al.* en 2005<sup>17</sup>, utilizando los mismos marcadores en 14 aislados del hongo obtenidos de murciélagos naturalmente infectados, capturados en México y con distintos hábitos migratorios (*Artibeushirsutus*-no migradores y *Leptonycterisnivalis*, *L. curasoeae*, *Tadarida brasiliensis mexicana*-migradores), sugieren la existencia de una nueva población genética de *H. capsulatum*, lo que contribuye al conocimiento de la diversidad genética del hongo.

**TABLA 1.** Clasificación taxonómica de *Histoplasma capsulatum*.<sup>2</sup>

Reino		Fungi	
División	Ascomycota		
Clase	Eurotiomycetes		
Orden	Onygenales		
Familia	Ajellomycetaceae		
	TELEOMORFO		ANAMORFO
Género	<i>Ajellomyces</i>	<i>Histoplasma</i>	
Especie	<i>Capsulatus</i>	<i>capsulatum</i>	
Variedades		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>capsulatum</i></li> <li>• <i>duboisii</i></li> <li>• <i>farciminosum</i></li> </ul>	



**Figura 1.** Distribución geográfica de los clados o poblaciones genéticas de *H. capsulatus*.<sup>16</sup>

*Ajellomyces capsulatus* es heterotálico: los dos tipos compatibles (+) y (-) se han aislado con igual frecuencia en la naturaleza, pero casi el 90% de las infecciones son causadas por el tipo (-).<sup>3</sup> La fase sexuada consiste en cleistotecios esféricos de 100 a 150  $\mu\text{m}$  de diámetro, con pared peridial plectenquimatosa laxa e hifas peridiales gruesas y espiraladas. Los ascos están irregularmente dispuestos en su interior, son globulosos y tiene 8 ascosporas elípticas.

El microorganismo tiene dos formas: la fase de micelio y la de levadura. La primera se presenta a temperatura ambiente, y la segunda a temperaturas iguales o superiores a 37 °C. La fase saprofitica o micelial puede dividirse en dos tipos de colonias: el tipo A (albino o blanco) y el tipo B (*brown* o pardo). El tipo A se caracteriza por desarrollar un micelio blanco, algodónoso, con abundantes hifas aéreas anchas; produce macroconidios y microconidios y no genera pigmentos difusibles al medio de cultivo. Las colonias tipo B se observan con micelio escaso, aplanado, de color canela a pardo oscuro con hifas pigmentadas estrechas y un gran número de macroconidios

tuberculados, con proyecciones en la superficie. Con frecuencia, entre los 10 y los 14 días la colonia se cubre de grandes masas de macroconidios y muy pocas hifas; los microconidios son escasos y difunde un pigmento marrón oscuro al medio.

Microscópicamente estos microconidios o microaleuriosporas se presentan sésiles, lisos, esféricos, piriformes o en forma de clava, sin septos, de pared fina, pudiendo medir de 2 a 5  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios o macroaleuriosporas se observan en conidióforos cortos, son generalmente esféricos, miden de 8 a 15  $\mu\text{m}$ , de paredes gruesas, sin septos, de aspecto tuberculado con apéndices digitiformes.

A menudo los aislamientos son del tipo B, particularmente cuando se aíslan del suelo. Estos cultivos del tipo B al envejecer pueden llegar a cubrirse de un micelio blanco y transformarse en el tipo A, de manera irreversible.<sup>18</sup>

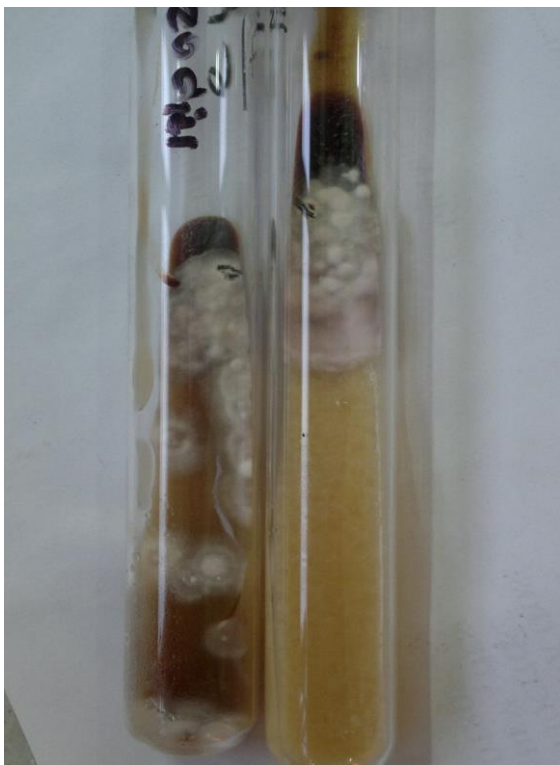
Se ha señalado que el tipo B es más patógeno para animales de laboratorio.<sup>19</sup>

En estado parasitario y en medios de cultivos enriquecidos a 37 °C, se observan células levaduriformes esféricas u ovaladas, de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de paredes finas y que se reproducen por gemación multipolar. *In vitro* se desarrollan colonias cremosas de color grisáceo a beige. La transición de la fase saprofítica a la de levadura es un paso fundamental en la infectividad del hongo. El estímulo para la transición es el calor. Desde un punto de vista genético, los primeros genes cuya transcripción aumenta tras la exposición al calor son el *cdc2* (un gen implicado en la progresión del ciclo celular) y el *yps-3* (gen específico de la levadura). También existe una mayor transcripción de los genes que codifican las proteínas del choque térmico, sobre todo la proteína del choque térmico 70.

Se han identificado tres etapas bioquímicas durante la conversión que sigue a la exposición a 37 °C. La etapa 1 se caracteriza por un desacoplamiento de la oxidación-fosforilación, disminución de la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) y proteínas y una disminución progresiva del ritmo respiratorio. Entre las 24 y 48 horas las células entran en un período de latencia o etapa 2, donde hay una marcada disminución de las concentraciones de los componentes del transporte de electrones mitocondrial y que

dura de 4 a 6 días. La etapa 3 se caracteriza por un reinicio de la respiración normal, inducción de la cisteína-oxidasa específica y la finalización de la transición a levadura.<sup>20</sup>

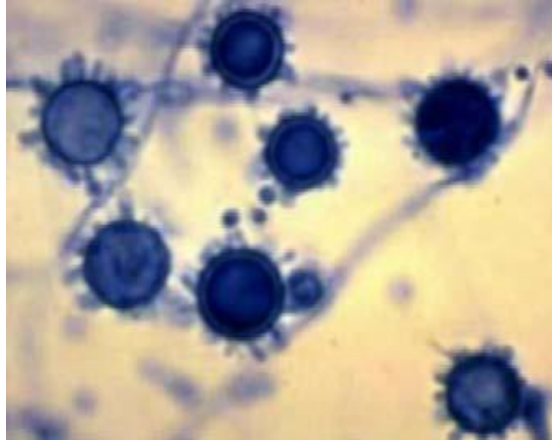
Durante la transformación, las hifas se fragmentan y dan lugar gradualmente a las levaduras. No ocurre lo mismo a partir de los conidios. El conidio primero germina y después ocurre la conversión gradual a levadura. Los brotes o yemas aparecen en el extremo más estrecho de la célula madre y permanecen unidas por una hebra angosta. Al principio la colonia es no vellosa y microscópicamente se puede observar una mezcla de hifas en proceso de conversión y células levaduriformes en gemación. En los siguientes subcultivos la colonia se convierte gradualmente en una colonia blanca grisácea, lisa y levaduriforme.<sup>21</sup> (Figuras 2 a 4).



**Figura 2.** Fase saprofítica o micelial de *H. capsulatum*. Colonias tipo A o blancas.

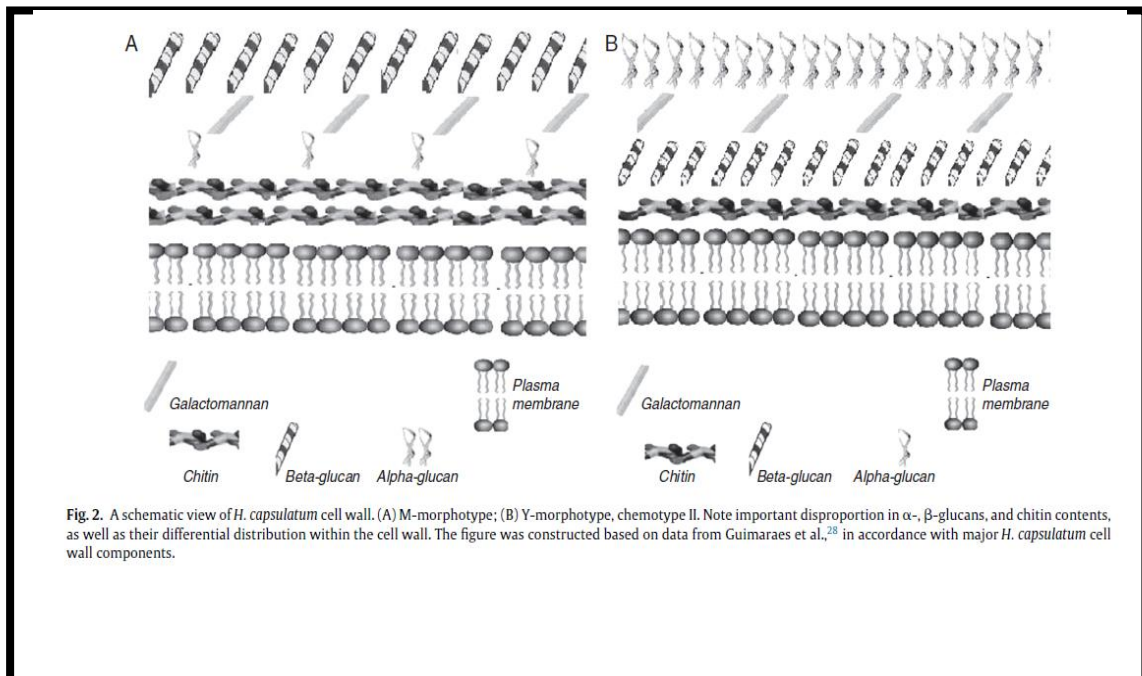


**Figura 3.** Fase levaduriforme de *H. capsulatum*.



**Figura 4.** Macroaleuriosporas o macroconidias de *H. capsulatum*

La pared celular de *H. capsulatum* está formada principalmente por  $\alpha$ -1,3 glucano,  $\beta$ -1,3 glucano y quitina. En comparación con otros hongos patógenos dimorfos el contenido de quitina es superior en este hongo. Sin embargo, existen diferencias en la composición de glucanos en las dos fases:  $\alpha$ -1,3 glucano es el componente principal de la fase levaduriforme, mientras que en la fase micelial es superior el contenido de  $\beta$ -1,3 glucano.<sup>22</sup>



**Figura 5.** Esquema de la composición de la pared celular en las fases micelial y levaduriforme de *H. capsulatum*.<sup>24</sup>

La presencia de altos niveles de  $\alpha$ -1,3 glucano se ha asociado con la virulencia de la cepa<sup>21</sup>, aunque se ha sugerido también la posibilidad de que una misma cepa pueda pasar del fenotipo  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(+)</sup> al  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(-)</sup> y viceversa, lo que podría ayudar a explicar la existencia de formas crónicas y latentes de histoplasmosis<sup>22</sup>. Otros autores han observado que estas formas levaduriformes con menor contenido en  $\alpha$ -1,3 glucano poseen en los tejidos una morfología distinta a la ovoide habitual, presentándose como levaduras grandes o alomorfos.<sup>23</sup>

El  $\beta$ -1,3 glucano es importante para las formas infectantes (fase micelial) de *H. capsulatum* y comparte varias características asignadas a los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs). Estos hidratos de carbono de la pared celular interaccionan con los fagocitos uniéndose a receptores tipo Toll y tipo lectina, que están presentes en las superficies celulares de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas.<sup>24</sup>

## 1.5. Ecología

*H. capsulatum* es un hongo cuyo hábitat es el suelo, que se ha aislado en muchas regiones del mundo y suele asociarse a los valles fluviales. Las condiciones que favorecen el crecimiento de este hongo en el suelo son una temperatura media de 22-29 °C, unas precipitaciones anuales de 890-1270 mm, y una humedad relativa del 67-87%. Estas condiciones suelen encontrarse en la zona templada, entre las latitudes 45 grados norte a 30 grados sur.<sup>25</sup>

El microorganismo se encuentra por lo general en los 20 cm más superficiales y prefiere el suelo ácido, con un alto contenido de nitrógeno y humedad, factores asociados generalmente al depósito y acumulación de excretas de aves y murciélagos<sup>26</sup>. En esas zonas, las partículas infectantes pueden superar las  $10^5$  por gramo de tierra. Es menos probable que el guano fresco contenga partículas infecciosas. Existe una fuerte asociación entre la presencia de excrementos de aves y de murciélagos y la de *H. capsulatum*. Las aves no se infectan por el hongo, y no se

ha logrado aislar *H. capsulatum* de su cloaca; probablemente debido a su temperatura corporal. Los murciélagos, por el contrario, transportan al hongo en su aparato digestivo y lo pueden eliminar en sus deyecciones<sup>27</sup>.

La remoción del suelo por excavaciones o edificaciones es uno de los medios más habituales de liberar elementos infecciosos que son inhalados y al final se depositan en los pulmones. Las personas implicadas en actividades recreativas o laborales que se expongan al suelo removido presentan un riesgo máximo de infección. Entre ellas están los espeleólogos que frecuentan las cuevas donde residen los murciélagos, los agricultores, los obreros que trabajan en la construcción, excavación y remodelación de edificios y aquellos viajeros a áreas endémicas que se expongan a estas fuentes de infección.

Se ha aislado *H. capsulatum* tanto a partir de espacios “abiertos” como cuencas fluviales, como en “espacios cerrados” relacionados con cavernas y construcciones abandonadas habitadas por aves y murciélagos.

## **1.6. Epidemiología.**

La histoplasmosis tiene una distribución cosmopolita, es endémica en regiones de clima tropical y templado sobre todo en el continente americano.

Aunque *H. capsulatum* crece solo en condiciones ambientales relativamente restringidas, se han descrito casos de histoplasmosis en todos los continentes, excepto en la Antártida. Gran parte de los conocimientos actuales acerca de la epidemiología de la histoplasmosis provienen del empleo de la prueba cutánea de histoplasmina en encuestas realizadas a partir de 1945 en diferentes regiones del mundo. Esto permitió delimitar las áreas endémicas y determinar la prevalencia de la enfermedad.<sup>28</sup>

La región de mayor endemidad en el mundo se localiza en la parte central-este de Estados Unidos, en los valles de los ríos Mississippi y Ohio, donde el 80-90% de la población suele ser positiva a la prueba de histoplasmina. Otras zonas endémicas

comprenden el sur de Canadá, Centro y Sudamérica, con casos publicados en México, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Puerto Rico, Panamá, Belice, Jamaica, Surinam, Cuba, Colombia, Venezuela, Brasil, Perú y Argentina.<sup>29, 30</sup>

Se ha estimado que la población infectada en los Estados Unidos asciende a 30.000.000, mientras que en Argentina es de aproximadamente 7.000.000 de personas.<sup>31</sup>

También se ha descrito la enfermedad en Asia, África y Oceanía.<sup>32-37</sup>

El primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de la naturaleza fue hecho por Emmons en 1949 a partir del suelo y posteriormente se han comunicado otros aislamientos de suelos de cavernas y minas.<sup>38</sup>

Los aislamientos de *H. capsulatum* de muestras ambientales han contribuido también al conocimiento de su biología y ecología y a la localización de la fuente de infección de los brotes epidémicos de histoplasmosis. La mayoría de los brotes de histoplasmosis han ocurrido por la realización de determinadas actividades en lugares donde se acumulan excretas de aves o murciélagos. Estas actividades generan gran cantidad de aerosoles que contienen las partículas infectantes del hongo, las cuales se diseminan en el aire e ingresan al sistema respiratorio.<sup>39</sup>

Una de las mayores epidemias de histoplasmosis que ha ocurrido tuvo lugar en Indianápolis (EE.UU) entre septiembre de 1978 y agosto de 1979, en la cual se estima que se infectaron unas 100.000 personas. De los 435 casos evaluados, 46 presentaron la forma diseminada de la enfermedad y 15 fallecieron. Esta epidemia se presentó en diversos puntos de la ciudad y es un ejemplo típico de la llamada “histoplasmosis urbana”, asociada a espacios abiertos.<sup>40</sup>

Otros brotes de histoplasmosis urbana se han relacionado al uso de tierras enriquecidas con abonos orgánicos (gallinaza, guano) para jardines y huertos.<sup>41</sup>

La histoplasmosis animal es conocida desde 1934 por los trabajos de William DeMonbreun en perros; es precisamente en esta especie animal donde la enfermedad clínicamente es muy semejante a la que se presenta en humanos. En perros y gatos

las infecciones suelen ser sistémicas, del tipo granulomatoso y ocurren generalmente en animales jóvenes.<sup>42, 43</sup>

El microorganismo se ha aislado también de numerosas especies de mamíferos entre las que se encuentran quirópteros, marsupiales, insectívoros, primates, roedores, carnívoros, etc.<sup>44, 45</sup>

Los conocimientos de la epidemiología de la histoplasmosis se han basado en los reportes de casos clínicos, los resultados de las encuestas con la prueba intradérmica de histoplasmina, los aislamientos del agente en la naturaleza y los estudios en animales. Con el advenimiento de las técnicas moleculares ha surgido la epidemiología molecular, permitiendo avances importantes tanto en la localización de nuevas zonas endémicas como en el conocimiento de la relación paciente-fuente de infección. La aplicación de las técnicas moleculares ha posibilitado la identificación de distintas fuentes de infección y la determinación de una relación genotípica entre aislamientos clínicos de pacientes procedentes de diferentes regiones, lo que ha contribuido al reconocimiento de áreas endémicas.

Entre las técnicas basadas en el estudio del ADN las de mejores resultados han sido: el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, (RFLP) y la amplificación aleatoria de polimorfismos de DNA (RADP).<sup>17, 46-48</sup>

### **1.7. Patogenia**

La infección por *H. capsulatum* se produce habitualmente por vía inhalatoria. Los elementos infectantes son las microaleuriosporas o microconidios de la fase filamentosa, o incluso pequeños fragmentos de hifas que llegan al alvéolo pulmonar. Una vez depositados en los alvéolos, son fagocitados por los neutrófilos y los macrófagos. La duración de la transición a la fase levaduriforme varía desde horas a días. Tras la transformación de los conidios a levaduras en los pulmones, éstas migran, quizás de modo intracelular hacia los ganglios linfáticos locales de drenaje y

luego a la circulación sistémica, produciendo focos inflamatorios en otros órganos como bazo, hígado o médula ósea.

Aunque todavía se desconocen muchos de los mecanismos relacionados con la patogenia de *H. capsulatum*, los principales determinantes de virulencia conocidos son los siguientes:<sup>49</sup>

**a) Dimorfismo térmico:** la fase micelial se convierte en una levadura brotante a 37 °C, lo cual ocurre en el sitio inicial de infección en los pulmones y también se puede lograr en cultivos de laboratorio. A pesar de que la temperatura es suficiente estímulo para la transición dimorfa, otras condiciones del medio ambiente son también importantes. Por ejemplo, se conoce que cisteína y adenosina monofosfato cíclico (cAMP) son compuestos que influyen en la morfogénesis de *H. capsulatum* y probablemente, habría participación de señales del hospedador aún no identificadas.

**b) Parasitismo intracelular de macrófagos:** Los conidios y las levaduras pueden entrar al macrófago por la vía tradicional de opson-fagocitosis, después de unirse a inmunoglobulinas y/o componentes del complemento. Un mecanismo alternativo que ha sido descrito y puede ser adaptativo para los hongos es la unión a miembros de la familia de la  $\beta_2$  integrinas o CD18 de mamíferos, que son receptores de superficie. Cada uno de los tres heterodímeros de este grupo lleva la molécula  $\beta_2$ /CD18 unida a una subunidad  $\alpha$ /CD11 distinta:

$\alpha_1/\beta_2$ (CD11a/CD18), comúnmente conocido como LFA-1;

$\alpha_M/\beta_2$ (CD11b/CD18), comúnmente conocido como MAC-1 o CR3;

$\alpha_X/\beta_2$ (CD11c/CD18), comúnmente conocido como P150,95 o CR4.

Estas 3 integrinas se expresan en los fagocitos profesionales, en particular los macrófagos. Los dominios de las integrinas a los cuales se une *H. capsulatum* son fundamentalmente CD18. La adhesina fúngica responsable de la unión específica es una proteína de choque térmico, la HSP60. Esta ruta de

internalización ha sido propuesta como un medio potencial para que *H. capsulatum* evada el estallido oxidativo de los fagocitos del hospedador y pueda así lograr su propia supervivencia.

**c) Localización subcelular:** las levaduras de *H. capsulatum* residen dentro de vacuolas unidas a membrana y no escapan al citoplasma. La supervivencia dentro de fagolisosomas, luego de la fusión fagosoma-lisosoma (FFL), y la permanencia en un fagosoma modificado, evadiendo la fusión fagolisosomal; son dos de los mecanismos patogénicos del parasitismo intracelular.

**d) Modulación del pH en el microambiente:** *H. capsulatum* puede sobrevivir *in vitro* en una amplia gama de pH. Sin embargo, el pH ácido de las vacuolas endosomales y particularmente, el de los fagolisosomas no es óptimo para el hongo y quizás más importante aún, activa la función de proteasa lisosomal y otras enzimas hidrolíticas. Un estudio en el cual se usó una línea celular P388D1 mostró que los fagolisosomas que contenían levaduras de *H. capsulatum* vivas mostraban un pH sustancialmente mayor que los fagolisosomas controles, que contenían levaduras muertas u otras partículas. Este hallazgo demuestra la capacidad fúngica de inhibir la acidificación vacuolar secretando un agente neutralizante o alcalinizante, o bien de ser capaz de modular las membranas del hospedador y así evitar la acidificación vacuolar. Una importante contribución para dilucidar este mecanismo se obtuvo con otro estudio, donde se utilizaron macrófagos murinos de la línea RAW 264,7 que mostraron una exclusión relativa de la bomba H<sup>+</sup>ATPasa de la membrana vacuolar que contenía levaduras de *H. capsulatum*. Esto indicaría la capacidad fúngica de excluir la bomba H<sup>+</sup>ATPasa de la membrana vacuolar, y de esta manera impedir que la membrana vacuolar del hospedador acidifique las vacuolas con levaduras y ataque al hongo con enzimas hidrolíticas de actividad óptima a pH ácido.

**e) Producción de catalasas:** el microorganismo confinado en la vacuola fagocítica está directamente expuesto a metabolitos tóxicos de oxígeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}^{2-}$  y  $\text{OH}^-$ ) que lo destruyen. *H. capsulatum* produce al menos tres isoenzimas de catalasa (CATA, CATB y C ATP) con las que evade el estallido oxidativo del fagocito. La regulación de la expresión de estas isoenzimas dependen tanto de la morfología celular, del estrés oxidativo y de la fuente de carbono<sup>50</sup>.

**f) Adquisición de hierro:** se propusieron al menos tres mecanismos para la adquisición de hierro por *H. capsulatum*:

- ✓ la liberación de hierro unido a la transferrina por descenso del pH.
- ✓ la producción y liberación de sideróforos, es decir pequeños compuestos que quelan hierro extracelularmente y pueden servir para abastecer al microorganismo.
- ✓ la reducción enzimática o no enzimática de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , debido a que tanto la transferrina como los sideróforos de *H. capsulatum* unen específicamente  $\text{Fe}^{3+}$ . La reducción del mismo produce la liberación de Fe desde estos componentes, haciendo que esté potencialmente disponible para el hongo.

**g) Adquisición de calcio:** se ha visto que las levaduras de *H. capsulatum* liberan una pequeña proteína de unión a calcio (CBP) en el medio de crecimiento. Además, el gen que codifica la CBP (*cbp1*) se expresa en la fase levaduriforme pero no en la forma micelial.

**h) Variación fenotípica:** además de la transición dimórfica, involucra la variación rugosa-lisa que ocurre en algunos linajes: fenotipo  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(+)</sup> al  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(-)</sup>. Se ha demostrado que el fenotipo rugoso, o  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(+)</sup> es relativamente virulento para el ratón, los macrófagos y las células epiteliales traqueales de hámster. El fenotipo  $\alpha$ -1,3 glucano<sup>(-)</sup> de menor virulencia sería responsable de la persistencia del hongo en el hospedador.

- i) **Producción de pigmentos tipo melanina:** la síntesis de melanina está asociada con la virulencia para varios hongos patógenos, entre ellos *H.capsulatum*, *C. neoformans*, *Exophiala dermatitidis* y *Sporothrix schenckii*. Estos proporcionarían, entre otras cosas, protección contra los macrófagos y agentes oxidantes<sup>51</sup>.

## 1.8. Manifestaciones clínicas.

Existen diferentes clasificaciones clínicas, siguiendo a Negroni, R.<sup>52</sup> se pueden mencionar:

### 1. Histoplasmosis en huésped inmunocompetente:

#### 1.1 Primoinfección asintomática o subclínica

#### 1.2 Primoinfección sintomática

- a) Formas respiratorias leves
- b) Forma neumónica en el contexto de brotes

#### 1.3 Manifestaciones de hipersensibilidad

- a) Pleuresía serofibrinosa
- b) Pericarditis serosa
- c) Eritema nodoso
- d) Artritis serosa

#### 1.4 Lesiones residuales de la primoinfección y formas mediadas por la respuesta inmune

- a) Focos de calcificación pulmonar y extrapulmonares
- b) Histoplasmosomas
- c) Mediastinitis fibrocásea (con síndrome de vena cava superior)

#### 1.5 Forma pulmonar crónica progresiva

- a) Infiltrados difusos e intersticiales biapicales

b) Lesiones cavitarias en los vértices de los pulmones

## **2. Histoplasmosis en el huésped inmunocomprometido**

### **2.1. Histoplasmosis diseminada crónica**

### **2.2. Histoplasmosis diseminada subaguda**

### **2.3. Histoplasmosis diseminada aguda**

La infección se produce habitualmente por vía inhalatoria. Durante las fases iniciales de la infección tanto los macrófagos cuanto los neutrófilos fagocitan las levaduras de *H. capsulatum*, pero no son capaces de lissarlas. Después de 2 o 3 semanas del contacto infectante los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se sensibilizan y comienzan a producir citoquinas pro-inflamatorias, con un ligero predominio de las de tipo Th1 (IL12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) que activan a los macrófagos, los que lisan las levaduras de *H.capsulatum* y se producen granulomas epitelioides compactos, que focalizan y controlan la infección. Estos cambios coinciden con el viraje de la intradermorreacción con histoplasmina de negativa a positiva y con una tendencia a la curación espontánea de la infección primaria. Suelen quedar como secuelas de esta infección focos calcificados en los pulmones, los ganglios linfáticos hilio-mediastinales, el hígado y el bazo. Excepcionalmente la infección puede producirse por vía cutánea, origina un síndrome chancriforme similar al de la esporotricosis e involuciona espontáneamente en un mes.

### **1.1 Primoinfección asintomática o subclínica**

La gran mayoría de las infecciones primarias (>90%) pasan desapercibidas desde el punto de vista médico. Lo más frecuente es que sean asintomáticas o que originen un cuadro gripal leve. Sin embargo, una pequeña proporción de personas desarrolla una enfermedad manifiesta. Es probable que el principal determinante para el desarrollo de los síntomas sea el tamaño del inóculo, la edad y la presencia de enfermedades subyacentes.

## **1.2 Primoinfección sintomática**

En aquellos que enferman, el período de incubación típico es de 7 a 21 días. La mayoría de los pacientes manifiestan síntomas hacia el día 14, los más destacados son la fiebre, que puede alcanzar los 42 °C, la cefalea, la tos no productiva, los escalofríos y el dolor torácico. Un porcentaje menor de pacientes presenta malestar general, debilidad, fatiga y mialgias. La mayoría de los síntomas desaparece en 10 días, pero puede persistir durante varias semanas si el inóculo es considerable.<sup>53</sup>

Las características radiológicas habituales son una neumonitis con patrón en parches, que al final se calcifica, y adenopatías hiliares. Si se ha producido una intensa exposición, se pueden desarrollar numerosos focos de neumonitis que se calcifican, y producen la denominada apariencia en perdigonada en las placas de tórax.

## **1.3 Manifestaciones de hipersensibilidad**

La infección pulmonar aguda puede acompañarse de algunas manifestaciones reumatológicas. Alrededor del 6% de los pacientes (la mayoría de ellos mujeres) presenta artralgias, eritema nudoso, y eritema multiforme. La artritis es muy infrecuente.<sup>54</sup>

Al menos un 6% de los pacientes con histoplasmosis presenta una pericarditis aguda. Son frecuentes el dolor torácico precordial y la fiebre. Una elevada proporción de los pacientes refiere una enfermedad respiratoria unas 6 semanas antes del comienzo de la pericarditis. La causa es la respuesta inflamatoria granulomatosa que aparece en los ganglios linfáticos mediastínicos adyacentes al pericardio.

#### **1.4 Lesiones residuales de la primoinfección y formas mediadas por respuesta inmune**

La histoplasmosis pulmonar cicatrizal muestra con frecuencia un complejo de Ghon y calcificaciones pulmonares. Otro rasgo característico de la infección primaria resuelta es la presencia de calcificaciones esplénicas o hepáticas.

Una complicación infrecuente de la histoplasmosis primaria es el desarrollo de una masa semejante a un fibroma, llamado histoplasmoma. Cuando aparece, casi siempre lo hace en el pulmón. La masa se compone de inflamación activa en la periferia y tejido fibroso en la esfera interna, y al final, la porción central se calcifica. En las radiografías, el histoplasmoma puede presentar un núcleo central o anillos de calcio, hallazgos útiles para distinguirlo de un crecimiento neoplásico.

Otra secuela infrecuente es la afectación del mediastino o mediastinitis fibrocásea. Este síndrome es bastante similar al observado en la tuberculosis, en la que la infección provoca un depósito masivo de tejido fibroso en el mediastino. Se desconoce el mecanismo responsable de esta intensa respuesta inmune. La fibrosis invade todas las estructuras mediastínicas, incluidas las vías respiratorias principales, la vena cava superior y el esófago. A medida que progresa la fibrosis, se puede producir hipoxemia, disnea, un síndrome de la vena cava superior y disfagia.<sup>55</sup>

#### **1.5 Forma pulmonar crónica progresiva**

La forma pulmonar crónica o histoplasmosis pulmonar cavitaria es una entidad clínica diferente. Se da sobre todo en pacientes con una neumopatía preexistente (enfermedad obstructiva pulmonar crónica o enfisema) por lo general varones, mayores de 50 años, grandes fumadores, de raza blanca. La infección pulmonar primaria no cura espontáneamente sino que genera focos de neumonitis crónica intersticial. El infiltrado inflamatorio se compone sobre todo de linfocitos y macrófagos, y suele encontrarse adyacente a la bulla. Después se desarrolla una necrosis semejante a la causada por un infarto y se cicatriza el parénquima afectado. La fase

de curación se caracteriza por fibrosis y retracción, que en algunos casos dejarán áreas centrales de necrosis caseosa rodeadas de células epitelioides, linfocitos y células gigantes. Esto conduce a un cuadro clínico similar a la tuberculosis crónica excavada. En más del 90% de los casos las lesiones cavitarias se encuentran en los vértices.

La asociación entre la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica e histoplasmosis cavitaria crónica sugiere que el defecto anatómico presente en estos pulmones predispone a los pacientes a esta forma clínica de infección y favorece la formación de cavidades.<sup>56</sup>

### **2.1 Histoplasmosis diseminada crónica**

Los factores de riesgo para presentar **histoplasmosis progresiva** o **histoplasmosis diseminada** son: niños menores de dos años de edad, adultos mayores de 54 años, en especial del sexo masculino, aún en ausencia de antecedentes claros de inmunodeficiencia; personas con diversos grados de compromiso de la inmunidad mediada por células, en especial los infectados por el VIH con recuentos de células CD4<sup>+</sup> inferiores a 200/μl; portadores de leucemias linfáticas tratadas con drogas antitumorales, los que padecen linfomas, los que reciben corticosteroides por lapsos prolongados (por ser receptores de trasplantes de órganos o por presentar enfermedades autoinmunes).

La exposición que provoca la histoplasmosis diseminada puede pasar desapercibida; sin haber ocurrido un episodio previo de histoplasmosis pulmonar aguda. Es decir, se puede desarrollar por la exposición a un gran inóculo de hongo o por la reactivación de focos endógenos latentes. Se considera que la gran mayoría de los casos se origina por una reactivación endógena, porque se desarrollan en personas que residieron en el pasado en un área endémica.

La reactivación de la infección latente puede desarrollarse a partir de órganos trasplantados. Se han comprobado casos graves de histoplasmosis diseminada en receptores de trasplantes de órganos, como hígado o riñón.<sup>57</sup>

La **histoplasmosis diseminada crónica** se presenta con mayor frecuencia en adultos mayores de 56 años, en su mayoría hombres (la relación hombre/mujer es de 10:1); otros factores predisponentes son la diabetes tipo II, el alcoholismo, el tabaquismo intenso y el uso de pequeñas dosis de corticoides durante lapsos prolongados.<sup>58</sup>

Se caracteriza por una evolución lenta y la presencia de granulomas bien definidos en los tejidos afectados, en los que se observan pocas levaduras. Las respuestas de hipersensibilidad retardada están intactas en una elevada proporción de estos pacientes. Los síntomas más frecuentes son el malestar general y el letargo. La fiebre es mucho menos frecuente (<30%) y suele ser febrícula. El signo físico más frecuente (50%) es una úlcera orofaríngea bien delimitada, indurada y por lo general profunda e indolora. La lengua, la mucosa yugal, la laringe, las encías y los labios constituyen las estructuras afectadas con mayor frecuencia. Las lesiones más frecuentes son las úlceras de bordes nítidos y de fondo granulomatoso, con menos frecuencia se ven procesos chancriformes, aftoides y erosiones de fondo granulomatoso similares a la estomatitis moriforme. Una manifestación muy característica, presente en el 10% de los enfermos, es la úlcera fisurada mediolingual situada en el centro de la lengua, en la unión de los dos tercios anteriores con el tercio posterior.

Estas lesiones suelen confundirse con un carcinoma epidermoide oral. Desde el punto de vista histopatológico, el centro de la lesión contiene macrófagos con muchas levaduras, pero la cantidad de dichos macrófagos disminuye en su zona periférica.<sup>59</sup>

En el tabique nasal se detectan ulceraciones cubiertas por costras sero-hemáticas (12% de los casos) y en la piel úlceras cutáneas de bordes nítidos y fondo granulomatoso.

En ocasiones aparecen lesiones chancriformes en los labios mayores o en el glande.<sup>31</sup>

Otro signo es la hepatoesplenomegalia, que aparece en alrededor de un tercio de los pacientes. La única manifestación de la infección puede ser la meningitis crónica o la hepatitis granulomatosa crónica. Se ha descrito la infección ósea, la enfermedad de Adisson y la endocarditis, pero estas entidades son poco frecuentes.

Las alteraciones hematológicas son infrecuentes y no suelen ser significativas.

La enfermedad puede persistir durante años, con períodos de mejoría sintomática espontánea, hasta que aparezcan síntomas en un único órgano.

## **2.2 Histoplasmosis diseminada subaguda**

Una de las características es la presencia de lesiones focales en varios sistemas orgánicos, como el aparato digestivo, las estructuras endovasculares, el sistema nervioso central y las glándulas suprarrenales.

Los signos físicos incluyen la hepatoesplenomegalia y las úlceras orofaríngeas.

Aparte del hígado y del bazo, el aparato digestivo es uno de los órganos afectados con más frecuencia. Se pueden encontrar células de levadura en la mucosa intestinal hasta en el 70% de las autopsias. Las ulceraciones macroscópicas de los intestinos delgado y grueso aparecen en el 40% de los casos y se ha descrito la perforación por úlceras penetrantes. Los lugares afectados con más frecuencia son el íleon terminal y el ciego.

La endocarditis y la infección de otras estructuras vasculares pueden ser manifestaciones de la histoplasmosis diseminada subaguda. La afectación de las válvulas aórtica y mitral es más frecuente que la de las del lado derecho, y la que se altera con mayor frecuencia es la aorta. Otras manifestaciones endovasculares son la endocarditis de las válvulas protésicas, y la infección de aneurismas de la aorta abdominal y de los injertos protésicos.

La infección del sistema nervioso central produce una serie de manifestaciones, como meningitis crónica, lesiones ocupantes de espacio y cerebritis.

Aunque los síntomas de la afectación de las glándulas suprarrenales no son frecuentes, las series de necropsias indican que las levaduras invaden estos órganos en alrededor del 80% de los casos. El aspecto macroscópico es de hipertrofia glandular. Este hallazgo post-mortem se ha apoyado en los aportes de la tomografía computarizada, en los que un elevado porcentaje de pacientes con histoplasmosis diseminada subaguda muestran glándulas suprarrenales agrandadas. La enfermedad de Adisson manifiesta es infrecuente, y ocurre en menos del 10% de los casos.

En los pacientes receptores de trasplantes de órganos sólidos, las infecciones fúngicas tienen una incidencia del 5,3% y el 22% de ellas son histoplasmosis. Todos los pacientes presentan la forma diseminada subaguda, pero entre las lesiones cutáneas hay un neto predominio de nódulos, gomas e hipodermis difusas.<sup>60</sup>

El sida constituye el factor de riesgo más importante para la presentación de las formas diseminadas subagudas en América del Sur, representa el 90% de los casos. Al principio de la pandemia del VIH, el 5% de los pacientes seropositivos que requerían internación presentaban esta afección, después de la introducción del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) se redujo al 2,5%.<sup>61</sup>

Las manifestaciones clínicas generales observadas con mayor frecuencia son: fiebre, pérdida de peso, astenia, anorexia, diarrea o vómitos, hepatoesplenomegalia, adenomegalias múltiples, tos, catarro mucopurulento, disnea y dolor torácico.

En América Latina, el compromiso cutáneo-mucoso se observa en el 80% de los pacientes, mientras que en Estados Unidos solo en el 6-10%. Las lesiones más frecuentes son pápulas de 3 a 4 mm de diámetro, rojizas, de consistencia firme, que se ulceran en el vértice y se cubren por una costra serohemática. Estas lesiones, antes de presentar una úlcera franca, poseen un aspecto muy semejante al molusco contagioso. Los casos más graves muestran máculas rojo-vinosas, múltiples de 5 a 10 mm de diámetro, que no se elevan sobre la piel. También se observan nódulos cubiertos por piel rojo violácea, y fría, algunos evolucionan a gomas y se ulceran. Con

menor frecuencia se ve hipodermatitis infiltrativa difusa, usualmente acompañada de nódulos y gomas o lesiones lupoides.<sup>62</sup>

### **2.3 Histoplasmosis diseminada aguda**

Las alteraciones más graves de la inmunidad generan las formas agudas, como se observan en pacientes VIH positivos con muy bajos recuentos de células T CD4<sup>+</sup> (menores a 100/ $\mu$ l), pacientes que reciben tratamientos para linfomas o leucemias y los receptores de trasplantes de órganos. También suele observarse en niños y lactantes de zonas endémicas; y se considera una progresión de una infección primaria o de una reinfección.

El comienzo suele ser brusco, y abarca unos pocos días. Las manifestaciones más frecuentes son la fiebre y el malestar general, pérdida de peso, tos y diarrea. Los signos físicos son: hepatoesplenomegalia, adenopatías y aproximadamente en un 30% estertores. Las alteraciones hematológicas son frecuentes. La anemia aparece en el 90% de los casos. La leucopenia y trombocitopenia se observan en el 80% de los niños. Las radiografías de tórax revelan casi siempre una neumonitis de patrón en parches con agrandamiento de los ganglios hiliares y mediastínicos. La mortalidad sin tratamiento es del 100%.

La histoplasmosis diseminada aguda vinculada al sida es detectada solo en el 10% de los casos y su curso es fatal. Predominan las manifestaciones clínicas generales sobre las focales; se presentan como un cuadro séptico grave, con fallo multiorgánico, shock y coagulación intravascular diseminada o como una insuficiencia respiratoria aguda del adulto. Las manifestaciones cutáneas suelen ser similares a las observadas en otras vasculitis infecciosas, como petequias y equimosis.<sup>62</sup>



Figura 6



Figura 7



Figura 8

**Figura 6-8** Paciente con lesiones orales, en paladar y lengua por *H. capsulatum*.



**Figura 9.** Máculas rojas-vinosas en paciente con histoplasmosis diseminada



**Figura 10.** Histoplasmosis en paciente con compromiso cutáneo (pápulas)

## **1.9. Diagnóstico micológico**

Para un adecuado diagnóstico, las muestras utilizadas dependen de la forma clínica, la localización de las lesiones y la metodología empleada. Entre las muestras podemos citar: escarificaciones o biopsias muco-cutáneas, esputos, lavados broncoalveolares, sangre, médula ósea, biopsias de ganglios, material de nódulos subcutáneos, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, etc.

Las técnicas de diagnóstico pueden ser clasificadas en:

- A) Métodos directos o microbiológicos, en los cuales se visualiza o se aísla directamente el microorganismo
- B) Métodos indirectos o inmunológicos, en los cuales se detectan anticuerpos producidos por el paciente y/o antígenos o moléculas derivados del microorganismo

### **A) Métodos microbiológicos o directos**

#### **A.1. Exámenes en fresco y coloraciones especiales:**

En el caso de la histoplasmosis, el examen en fresco de la muestra clínica (observación de la muestra directamente entre porta y cubre con o sin KOH), no tiene mucho valor debido a que el microorganismo se encuentra a nivel intracelular y es muy pequeño (2-4 $\mu$ m), lo que dificulta la observación al microscopio. Sin embargo, las coloraciones especiales como Wright, Giemsa, el ácido periódico de Schiff (PAS) y la metenamina plata de Grocott, realizadas a partir de muestras respiratorias como lavados broncoalveolares y esputos, biopsias de tejido, escarificaciones cutáneas y extendidos de médula ósea se usan con frecuencia para el diagnóstico de esta micosis.

La observación microscópica de estas tinciones permite visualizar las levaduras intracelulares, localizadas en el citoplasma de macrófagos y células fagocíticas del sistema inmune. Con las coloraciones de Giemsa o Wright se tiñen de manera parcial y aparecen rodeadas de un halo claro o casquete polar lo que da el aspecto de una

falsa cápsula. Con tinciones específicas para hongos como Grocott se observan levaduras pequeñas de color marrón oscuro por la precipitación de los iones de plata. (Figuras 11 y 12).

La sensibilidad de los métodos basados en tinciones depende de la forma clínica de la micosis y de la experiencia del observador.<sup>63</sup> (Tabla 2)

**Tabla 2.** Porcentajes de sensibilidad de las pruebas en el diagnóstico convencional de la histoplasmosis de acuerdo con la forma clínica de la micosis.<sup>63</sup>

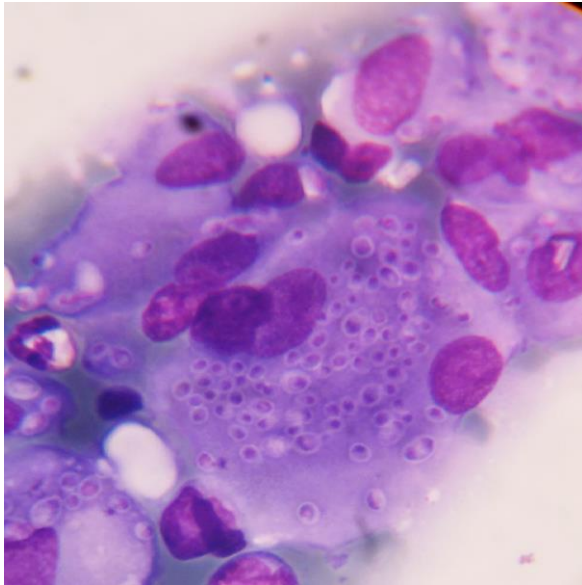
Pruebas de laboratorio	HPA	HPC	HPD
Coloraciones*	10%	17-40%	43%
Cultivos	15%	50-85%	50-85%
Serología**	95%	90-100%	70-80%
ELISA (detección de antígenos)	25-75%	15-22%	92%

HPA: Histoplasmosis pulmonar aguda, HPC: Histoplasmosis pulmonar crónica, HPD: Histoplasmosis progresiva diseminada; \* Wright, Giemsa, Grocott; \*\* Inmunodifusión y Fijación de complemento.

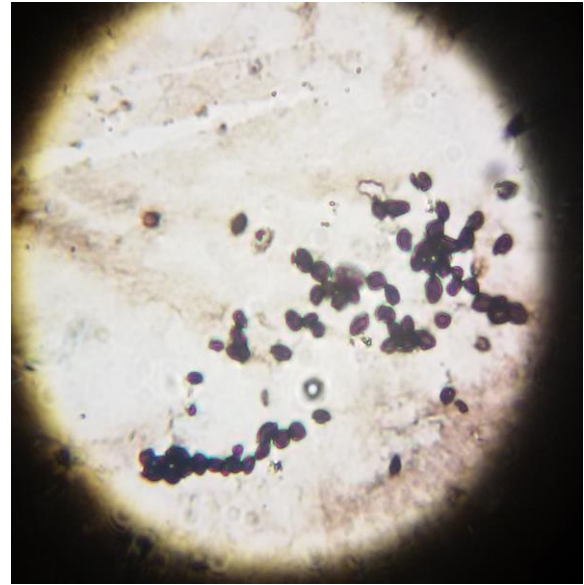
Dada la elevada frecuencia de lesiones cutáneas y mucosas en Latinoamérica, su escarificación o las biopsias cutáneas son de gran utilidad para el diagnóstico rápido de esta afección. La toma de muestra se realiza luego de la asepsia de la piel, se levanta la costra que cubre la lesión y se toma material del fondo de la misma con una hoja de bisturí y se preparan extendidos para colorear con Giemsa. Las biopsias remitidas en solución salina estéril, permiten realizar cultivos. En más del 60% de los pacientes con histoplasmosis asociada al sida en el Hospital de Infecciosas F. Muñiz el diagnóstico se obtuvo por escarificación o biopsia de lesiones cutáneas.<sup>61, 64, 65</sup>

La observación previa coloración de las muestras también presenta falsos positivos, ya que las levaduras de *H. capsulatum* se pueden confundir con otros microorganismos entre los que se incluyen: *Candida* spp., *Penicillium marneffeji*, *Leishmania* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, además

de artefactos. Por esto; generalmente se recomienda que las coloraciones se acompañen del cultivo.



**Figura 11.** Escarificación cutánea coloreada con Giemsa, se observan las levaduras de *H. capsulatum*



**Figura 12.** Levaduras de *H. capsulatum* coloreadas con Grocott en un lavado broncoalveolar.

## A.2 Cultivo e identificación

Para realizar cultivos, el laboratorio clínico debe estar equipado con cámaras de bioseguridad nivel II-III y personal capacitado en la manipulación del hongo.

Los medios de cultivo utilizados son: el agar infusión cerebro y corazón (BHI del inglés “brain heart infusión”) con o sin sangre de carnero, el agar Sabouraud glucosado o el agar Sabouraud glucosado más cicloheximida y cloranfenicol (Mycosel, BBL®). En este último medio, se inhibe el crecimiento de hongos saprofitos contaminantes y se frena el desarrollo de las bacterias.

Para los hemocultivos, el método de elección es el de lisis-centrifugación. La sangre extraída se pone en contacto con sustancias líticas, como la saponina, que destruye los eritrocitos y leucocitos y libera en el medio las levaduras intracelulares. En el Hospital Muñiz entre los años 1999 y 2008, el 72,8% de los pacientes con

histoplasmosis asociada a sida presentaron hemocultivos positivos por el método de lisis centrifugación. En éste mismo Hospital se desarrolló un método de lisis-centrifugación que tiene el mismo rendimiento que el comercial (Isolator<sup>®</sup>).<sup>66</sup>Esta técnica también es de gran valor en enfermos con otros tipos de inmunocompromiso. Existen actualmente en el mercado, equipos de hemocultivos automatizados con botellas con agentes líticos para el cultivo de organismos intracelulares (**Bactec Myco/f-Lytic<sup>®</sup>BD**)

La incubación a 28 °C permite el desarrollo de la fase micelial entre los 10-15 días aunque a veces es necesario mantener los cultivos hasta 30 días. Desarrollan colonias algodonosas, blancas o beige, que pueden ser granulares o levemente pulverulentas. Al microscopio se observan hifas septadas, delgadas, hialinas y los elementos de fructificación: microconidios y macroconidios tuberculados. Los macroconidios son muy característicos y son la base de identificación de género y especie; junto con la conversión a fase de levadura o dimorfismo.

Algunos hongos saprófitos como *Chrysosporium* spp. y *Sepedonium* spp. también producen macroconidios equinulados muy semejantes a los de *H. capsulatum*, aunque a diferencia de éste, no crecen como levaduras a 37 °C.

Los cultivos presentan valores de sensibilidad variable, que dependen de la forma clínica de la micosis y pueden alcanzar hasta un 85% de sensibilidad en los casos de histoplasmosis pulmonar crónica y diseminada (Tabla 2).

**Conversión a fase levaduriforme:** Esta prueba se considera un paso confirmatorio en la identificación de *H. capsulatum*. Teniendo en cuenta que hay cepas atípicas de este hongo que no fructifican y considerando la semejanza de sus macroconidios con los de otros hongos saprófitos se le ha dado gran valor a la conversión de la fase micelial a la levaduriforme para un diagnóstico definitivo. Este es un proceso gradual y lento, y en ocasiones difícil de obtener. Para lograrlo se debe transferir un fragmento de micelio de *H. capsulatum* a un medio enriquecido como agar BHI con sangre de

carnero o agar sangre con cisteína e incubar a 37 °C. Deben realizarse subcultivos sucesivos en las mismas condiciones hasta hacer evidente el cambio a levadura.<sup>2</sup>

**Prueba de exoantígenos:** Mediante esta prueba se detectan antígenos solubles específicos elaborados por el hongo en los primeros estadios de su crecimiento y generalmente se aplica para la identificación de un cultivo desconocido sin la manipulación que genera su estudio micromorfológico, y por consiguiente evitando el riesgo de una infección accidental<sup>67</sup>. Sobre el tubo de cultivo en Sabouraud de 10 días se agrega 8-10 ml de una solución merthiolato-borato de sodio (1:10.000) y se deja 24-48 h a temperatura ambiente, allí van a liberarse antígenos solubles libres de células (en este caso corresponden a los antígenos H y M). Se recoge este líquido, se concentra por ultrafiltración y se realiza una inmunodifusión frente a anticuerpos específicos para ver las bandas de precipitación.

## **B) Métodos inmunológicos o técnicas indirectas**

### **B.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS**

Las pruebas serológicas han sido de gran valor en el diagnóstico de la histoplasmosis, no solo por su relativa rapidez en comparación con los métodos de cultivo e identificación, sino porque en muchas ocasiones, son la primera y a veces la única evidencia de infección. Estas técnicas emplean como antígeno extractos obtenidos tanto de la fase filamentosa como de la levaduriforme de *H. capsulatum*.<sup>68</sup>

No obstante, estas técnicas presentan algunas limitaciones:

- 1) Pueden ocurrir falsos negativos en la infección temprana, ya que se requieren de dos a seis semanas para que el paciente produzca anticuerpos (AC) después de haber estado expuesto al hongo.

- 2) En los pacientes inmunosuprimidos, en especial aquellos con sida se presentan niveles de sensibilidad muy bajos debido a la disminución en la producción de AC que caracteriza este síndrome.
- 3) Pueden ocurrir falsos positivos por reacciones cruzadas con otras micosis (paracoccidioidomicosis, blastomicosis y aspergilosis).
- 4) Los AC pueden permanecer durante años, lo cual no siempre sugiere histoplasmosis activa.

### **B.1.1 Fijación de complemento (FC)**

Detecta y mide la presencia de AC fijadores de complemento específicos contra el hongo, presentes en el suero o LCR de los individuos infectados. Se usan antígenos obtenidos tanto de la forma micelial como de levadura. Los títulos de AC entre 1:8 y 1:16 son considerados sugestivos de un posible contacto con el hongo; mientras que títulos de AC mayores a 1:32 se consideran indicadores de histoplasmosis activa.<sup>63</sup>

La prueba de FC es más sensible que la inmunodifusión pero requiere experiencia y habilidad por parte del operador.

### **B.1.2 Inmunodifusión (ID)**

La ID en gel de agarosa permite identificar dos bandas de precipitación, denominadas **H** y **M**, que corresponden al reconocimiento de AC específicos presentes en el suero de pacientes contra tales antígenos. Los antígenos **H** y **M** son glicoproteínas que suelen ser liberadas en cultivos de ambas formas, micelial y levaduriforme. El antígeno **H** tiene homología con una  $\beta$ -glucosidasa; cuando está presente indica infección activa. El antígeno **M** tiene homología con una catalasa y su presencia no permite diferenciar una infección reciente de una pasada, dado que los AC contra este antígeno pueden persistir por meses y hasta años después de la primoinfección. También es positiva la ID frente a este antígeno en pacientes que se les ha realizado recientemente la prueba intradérmica con histoplasmina. En un gel de agarosa, la

banda **M** aparece más próxima al pocillo del antígeno, mientras que por el contrario la banda **H** se sitúa más cercana al suero del paciente. Mediante la técnica de Western blot se ha podido precisar que a estas bandas de precipitación le corresponden pesos moleculares de alrededor de 120 kDa y 94 kDa (**H** y **M** respectivamente).

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de FC e ID en la determinación de AC contra *H. capsulatum* dependen de la forma clínica de la micosis.<sup>69</sup> Aunque la prueba de FC presenta una sensibilidad más alta en comparación con la ID, esta última es mucho más específica independientemente de la forma clínica de la histoplasmosis. (Tabla 3).

**Tabla 3.** Sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la histoplasmosis.<sup>63</sup>

<b>Pruebas</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>
<b>Fijación de complemento</b>		
• <b>Antígeno levadura</b>	94,3	70-80
• <b>Antígeno micelial</b>	72,8	70-80
<b>Inmunodifusión</b>		
• <b>Banda M</b>	76	95
• <b>Banda H</b>	23	95

### **B.1.3 Contrainmunolectroforesis (CIE)**

De mayor sensibilidad que la ID. Combina la aplicación de un campo eléctrico a través del gel y la migración del antígeno y los anticuerpos para concentrarse en una zona de reacción entre los pocillos donde forman una banda de precipitación.

#### **B.1.4 ELISA**

Los métodos inmuno-enzimáticos para la detección de AC contra *H. capsulatum* han sido poco utilizados debido a la dificultad para su estandarización y a su difícil interpretación. Guimaraes y colaboradores<sup>70</sup> desarrollaron un ensayo inmuno-enzimático en el que utilizaron como antígeno la histoplasmina deglicosilada, con el cual se obtuvieron valores altos de sensibilidad (92%) y especificidad (96%).

### **B.2 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS**

#### **B.2.1 Técnicas tradicionales de diagnóstico**

El uso de las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) y ELISA y el empleo de AC monoclonales han permitido detectar, en pacientes con histoplasmosis la presencia de antígenos de tipo polisacárido en muestras de fluidos corporales como orina, suero, lavados broncoalveolares y LCR. Estas técnicas son una herramienta importante no solo para el diagnóstico de la histoplasmosis, sino para el seguimiento de los pacientes y la determinación de su respuesta al tratamiento. De igual forma, son fundamentales para el diagnóstico de la micosis en pacientes con algún grado de inmunosupresión, principalmente en pacientes con sida.

En los casos de histoplasmosis diseminada, la detección de antígenos permite realizar un diagnóstico temprano, incluso antes de que el microorganismo se aísle en cultivo. Además esta prueba suele dar positiva mucho antes de la aparición de los AC.

Aunque la sensibilidad del ELISA en la detección de antígenos presenta valores altos (hasta del 90%), esta depende en gran parte del tipo de muestra utilizada y de la forma clínica. Se sabe que muestras como la orina son más sensibles que el suero o plasma. La detección de antígenos en suero y especialmente en orina mediante pruebas de ELISA es rutinaria en Estados Unidos, donde existen al menos tres equipos comerciales de primera y segunda generación.<sup>71</sup> En nuestro país no se encuentran disponibles actualmente.

La Tabla 4 resume algunos valores de sensibilidad en la detección de antígenos de pacientes con histoplasmosis diseminada. Además de presentar reacción cruzada con otras entidades tales como paracoccidioidomicosis, blastomicosis, coccidioidomicosis y penicilosis; la detección de antígeno tanto en orina como en suero pueden presentar falsos positivos debido a diversos factores como la presencia de AC IgG inespecíficos y el factor reumatoideo. También pueden darse falsos negativos, debido a una carga fúngica baja al momento de la toma de muestra o al uso de antifúngicos.<sup>63</sup>

**Tabla 4.** Porcentajes de sensibilidad de las pruebas serológicas y detección de antígenos en pacientes con histoplasmosis progresiva diseminada.

Prueba	Estado inmune de los pacientes		
	Inmunocompetente	sida	Otros*
<b>Serología</b>			
<b>ID</b>	71-100%	58-60%	57-77%
<b>FC</b>	85-97%	60-70%	60-79%
<b>Detección de Ag</b>			
<b>Antigenuria</b>	80%	95%	82%
<b>Antigenemia</b>	67%	86%	60%

Ag: Antígeno, \*Pacientes con cáncer y otras enfermedades onco-hematológicas, trasplantados de órganos sólidos o que reciben terapias inmunosupresoras.<sup>62</sup>

Son varios los reportes sobre la estandarización de nuevas pruebas de ELISA que utilizan AC monoclonales o policlonales, que buscan mejorar la sensibilidad y la especificidad. Desafortunadamente, aún no están disponibles en nuestro país.<sup>72-74</sup>

Las pruebas basadas en RIA para detectar antígenos en suero y orina de individuos infectados, presenta una alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, requiere de un equipo sofisticado y está disponible solo en los laboratorios de tercer y cuarto nivel de complejidad.

Las técnicas para detectar 1-3  $\beta$ -D-glucano son frecuentemente utilizadas en pacientes inmunocomprometidos graves, para el diagnóstico indirecto de varias micosis oportunistas, especialmente aspergilosis y candidiasis, pero puede dar resultados positivos en pacientes con histoplasmosis diseminada.<sup>75</sup> Tampoco se dispone de esta metodología en Argentina.

### **B.2.2 Técnicas moleculares de diagnóstico**

Estas técnicas moleculares, basadas en su mayoría en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction”) o modificaciones de ésta incluyen:

- La PCR anidada (nested-PCR)
- La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, del inglés “quantitative real time Polymerase Chain Reaction”)
- Secuenciación del fragmento amplificado por PCR anidada

Existen varios informes sobre la utilización de herramientas moleculares para el diagnóstico de la histoplasmosis. Estos se basan en la amplificación de una variedad de genes blanco del microorganismo, cuyos valores de sensibilidad y especificidad son variables (69-100% y 77-100%, respectivamente), y que también dependen de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación.

En varios trabajos publicados, han desarrollado pruebas de PCR anidada que amplifica la subunidad pequeña 18S del ARN ribosomal (ARNr), y una secuencia del gen *hc100* (proteína de 100kDa, única y específica de *H. capsulatum*).<sup>76-78</sup>

Otros estudios han empleado como genes blanco aquellos que codifican para los antígenos H y M, y los espaciadores de transcritos internos (ITS, del inglés “Internal Transcribed Spacer”) de los genes que codifican para el ARNr.<sup>79-82</sup>

Asimismo, Buitrago y colaboradores<sup>83</sup> realizaron estudios de reproducibilidad, sensibilidad y especificidad de una qPCR que amplificaba una secuencia ITS de los genes ARNr de *H. capsulatum*.

En los últimos años, se han publicado trabajos que buscan mejorar la sensibilidad, especificidad, eficiencia y eficacia de las pruebas moleculares para el diagnóstico de la histoplasmosis en diferentes muestras clínicas, principalmente especímenes respiratorios, biopsias y líquidos corporales (LCR, sangre entera, orina). La mayoría de las pruebas incluyen la PCR anidada y la PCR en tiempo real, que alcanzan valores de sensibilidad y especificidad que oscilan entre 90% y 100% respectivamente.<sup>78, 84, 85</sup>

### **1.10 Prueba intradérmica con histoplasmina**

Esta prueba permite evaluar la respuesta de hipersensibilidad mediada por células tipo IV (retardada). Consiste en la inoculación por vía intradérmica de 0,1 ml de histoplasmina (antígeno metabólico obtenido del filtrado de un cultivo en medio semisintético de la fase filamentosa de *H. capsulatum* previamente diluido y estandarizado).<sup>86</sup> Después de la inoculación la reacción inflamatoria se intensifica alcanzando su máximo a las 48 h y se observa en la superficie de la piel un área eritematosa y una induración palpable, que es la verdaderamente significativa. La lectura se realiza a las 48 h y se consideran positivas aquellas induraciones de 5 mm o más.<sup>2</sup> Se considera que esta prueba se hace positiva entre los 15 y 40 días siguientes al contacto con el agente causal. Su valor diagnóstico es limitado, ya que no discrimina entre infección pasada y reciente, sin embargo ha sido una herramienta importante en el conocimiento de la epidemiología de la histoplasmosis ya que ha permitido delimitar áreas endémicas.

Esta prueba se negativiza en estados anérgicos, lo cual es un indicio de mal pronóstico en aquellos pacientes diagnosticados con la enfermedad.

Uno de los inconvenientes que presenta la prueba de histoplasmina es que puede inducir la formación de anticuerpos y por consiguiente dar falsos positivos en los resultados de las pruebas serológicas.<sup>87</sup>

Según algunos autores puede existir cierto grado de reactividad cruzada entre la histoplasmina y otros antígenos fúngicos (paracoccidiodina, blastomicina,

coccidioidina).<sup>88</sup> Sin embargo, la positividad a más de uno de éstos antígenos puede estar determinada por la coexistencia de más de una especie fúngica en una misma área endémica.<sup>89</sup>

### **1.11 Antifúngicos y tratamiento**

Los compuestos azólicos, tales como el ketoconazol, el itraconazol, el fluconazol y el posaconazol, así como la anfotericina B, son activos *in vitro* e *in vivo* frente a *H. capsulatum*. La elección del antifúngico, así como la dosis y su forma de administración, dependen de las manifestaciones clínicas del paciente así como de las patologías asociadas y sus tratamientos.

En el caso de la histoplasmosis asociada al sida, la dosis diaria de itraconazol se eleva a 600 mg los dos primeros días para acelerar el plazo requerido para la estabilización del área bajo la curva, y luego se sigue con 400 mg/día. Después del tratamiento inicial de 2 a 3 meses y cuando el paciente ha mejorado, se inicia el tratamiento supresivo o profilaxis secundaria, que se realiza con itraconazol a razón de 200 mg/día hasta que el paciente presente dos recuentos de células CD4<sup>+</sup> superiores a 150/μl, separados por 3 meses de intervalo. Si el paciente no puede recibir este tratamiento, se le indica anfotericina B, 50 mg 2 veces por semana. En los otros casos de inmunosupresión prolongada no relacionada al sida, no hay una norma de profilaxis secundaria establecida, pero se tiende a prolongar el tratamiento supresivo durante un año.

Las razones para indicar anfotericina B en lugar de itraconazol son: evolución aguda, gravedad extrema, compromiso del sistema nervioso central, presencia de vómitos y/o diarrea y tuberculosis activa, que requiera rifampicina para su tratamiento.

Aunque el posaconazol parece ser una droga muy activa, tanto en la histoplasmosis experimental como en la humana, la experiencia clínica con éste fármaco es aún escasa.<sup>62</sup>

En la Tabla 5 se resumen los esquemas de tratamiento más empleados de acuerdo con cada forma clínica.

**Tabla 5.** Tratamiento de la histoplasmosis diseminada progresiva.<sup>62</sup>

Forma clínica	Droga	Administración	Dosis/día	Duración
<b>Diseminada crónica</b>	Itraconazol	Oral	100-200 mg	6 meses
	Anfotericina B	IV	0,7 mg/kg	2-3 meses
	Ketoconazol	Oral	400 mg	12 meses
<b>Diseminada subaguda</b>	Itraconazol	Oral	400 mg	3 meses*
	Anfotericina B	IV	0,7 mg/kg	2-3 meses
<b>Diseminada aguda</b>	Anfotericina B	IV	0,7 mg/kg	2-3 meses

\* luego seguir con 200 mg/día por lapsos variables.

Tanto en las neumonías agudas de las epidemias como en la histoplasmosis pulmonar crónica, se emplea el itraconazol como droga de elección. La dosis de 400 mg/día suele ser la indicada en los EE.UU., en nuestro país se pueden manejar con dosis de 200 mg/día. El tratamiento es de 3 meses para las neumonías agudas y 1 año para las formas crónicas.

### 1.12 Histoplasmosis en Argentina

En Argentina la histoplasmosis es endémica en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba, Este de La Pampa, Sur de Salta, norte de Tucumán, norte de Corrientes, este y centro de Chaco. En la llanura del Río de La Plata las tasas de infección oscilan alrededor del 30%. Existen otras áreas geográficas donde los índices de reactividad a histoplasmina son elevados: 40,5% en Salta, entre 15-73% al noreste de Córdoba y entre 20-53% en Tucumán.<sup>90-96</sup>

Hasta el 2002 no se habían comunicado casos de histoplasmosis en las provincias más australes de nuestro país. En ese año se describe un brote de histoplasmosis

cercano a la ciudad de Zapala, provincia de Neuquén, Patagonia Argentina. El brote se asoció a exposición laboral de un conjunto de obreros que realizaban tareas de reparación de caminos y alcantarillas pluviales.<sup>97</sup> En años posteriores fueron notificados nuevos brotes en la provincia de Buenos Aires.<sup>39, 98</sup>

De un estudio realizado en el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán” surge que del total de micosis profundas diagnosticadas entre enero y diciembre de 2004, las más frecuentes fueron fungemia por levaduras (34%), criptococosis (20%), aspergilosis broncopulmonar (13%), histoplasmosis (11%), paracoccidiodomicosis (7%) y neumocistosis (5%). Los datos fueron provistos por laboratorios de 19 provincias y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires; y en contraste con lo publicado anteriormente la histoplasmosis aumentó, ubicándose como la micosis endémica más frecuente en Argentina, superando a la paracoccidiodomicosis.<sup>99, 100</sup>

### **1.13 Histoplasmosis en la ciudad de Bahía Blanca**

La ciudad de Bahía Blanca, está ubicada al sur de la provincia de Buenos Aires, sobre la costa del Océano Atlántico, a 38° 44" de latitud sur y 62° 16" de longitud oeste, a 83 metros sobre el nivel del mar y a 730 Km de la Capital Federal.

El clima es templado con valores medios anuales de temperatura entre 14°C y 20°C con estaciones térmicas bien diferenciadas. Las lluvias otorgan un carácter sub-húmedo o de transición, siendo la media de los últimos 5 años de 683 mm<sup>3</sup> / año. Los vientos predominantes son del cuadrante noroeste, siendo la velocidad media anual del viento de 19,8 km /h.

La ciudad se presenta como cabecera del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, con una producción de base agrícola-ganadera, consolidándose como centro urbano proveedor de bienes y servicios para la zona circundante. Es elegida para el

asentamiento de importantes empresas agroindustriales y del sector petroquímico, dando lugar a un proceso de industrialización, que en estos últimos años se ha convertido en el motor dinamizador de la economía de la ciudad. Se encuentra a solo 8 km de los puertos de Ingeniero White y Galván.

La población estimada, según el censo que el año 2010 llevó a cabo el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC) es de 301.501 habitantes; el 51,8% eran mujeres y el 48,2% varones.

En la ciudad de Bahía Blanca no se han realizado estudios epidemiológicos sobre *H. capsulatum*, y no se han documentado reportes de casos o brotes.

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En Argentina, la incidencia de esta micosis es difícil de precisar. La inexistencia de registros nacionales unificados sobre *Histoplasma capsulatum*, la escasa cobertura diagnóstica atribuible quizás a la escasez de personal capacitado para sospechar y/o diagnosticar microbiológicamente esta enfermedad, y la falta de obligatoriedad de declararlas, solo nos permite tener un conocimiento parcial, esporádico y subestimado de la histoplasmosis en nuestro país <sup>99</sup>.

En la ciudad de Bahía Blanca, si bien se han conocido casos de pacientes con diagnóstico de histoplasmosis, estos casos no han sido debidamente documentados y no se han realizado estudios epidemiológicos que demuestren la presencia de *Histoplasma capsulatum* como agente de micosis autóctona.

Para determinar la presencia de *H. capsulatum* en Bahía Blanca sería necesario realizar su búsqueda, aislamiento e identificación a partir de fuentes ambientales.

La prueba intradérmica con histoplasmina si bien tiene un valor diagnóstico limitado, sería una herramienta importante para el conocimiento de la epidemiología de la histoplasmosis en la ciudad, ya que ha permitido delimitar áreas endémicas<sup>29</sup>.

El aislamiento del hongo a partir de muestras clínicas y ambientales, permitiría profundizar los conocimientos sobre agentes endémicos y modificar conductas diagnósticas y terapéuticas frente a casos similares, así como también la implementación de medidas preventivas en relación con la exposición.

Además, el aislamiento del hongo permitiría caracterizarlo genéticamente y comparar el grado de homología con otras cepas aisladas de Argentina u otros países.

Por todo lo expuesto, resultaría de importancia el conocimiento de esta enfermedad y su agente causal en nuestro medio, lo cual contribuiría a evitar y controlar los brotes epidémicos así como su adecuado diagnóstico y tratamiento.

### 3. HIPÓTESIS

Estudios ambientales, poblacionales y de casos autóctonos colocan a la ciudad de Bahía Blanca en la zona endémica para *H. capsulatum*.

#### 4. OBJETIVOS

##### Objetivo General

Determinar si la ciudad de Bahía Blanca debe ser considerada como zona endémica para *Histoplasma capsulatum* y así contribuir al diagnóstico, prevención y control de la enfermedad.

##### Objetivos Específicos

- 1) Establecer la búsqueda de *H. capsulatum* en diferentes reservorios naturales.
- 2) Realizar una encuesta epidemiológica en la población, utilizando la reacción intradérmica con histoplasmina.
- 3) Identificar posibles casos autóctonos de histoplasmosis en pacientes con manifestaciones clínicas compatible con la enfermedad. Aislar *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño de la Investigación:**

Se realizó un estudio descriptivo, observacional de corte transversal durante un período de 25 meses, desde mayo 2013 hasta junio 2015.

### **5.1 Búsqueda de *H. capsulatum* en reservorios ambientales**

#### **Población:**

Con el objetivo de detectar la presencia de *H. capsulatum* mediante su aislamiento, se muestrearon y analizaron reservorios en los cuales se vincula al hongo en la bibliografía. Se dividieron en tres grupos:

- a) Espacios abiertos: plazas, parques, tierras cercanas a cursos de agua
- b) Espacios cerrados: galpones, construcciones y casas abandonadas
- c) Hábitats relacionados a murciélagos y aves: gallineros, juntas de separación de edificios, etc.

#### **Recolección de las muestras:**

De cada sitio a estudiar se tomaron muestras por duplicado. Cada muestra consistió en tierra, pudiendo contener deyecciones de aves y/o murciélagos, plumas y demás restos orgánicos; de aproximadamente 100-200 g cada una. Fueron colocadas en recipientes estériles utilizando cucharas previamente flameadas en alcohol; y trasladadas al laboratorio antes de las 72 horas.

#### **Procesamiento de las muestras:**

Las muestras se almacenaron en el laboratorio, refrigeradas a 5 °C durante 24 horas hasta ser procesadas.

Los pasos fueron los siguientes:

- 1) Se tomaron 20 g de cada muestra y se coloraron en matraces de Erlenmeyer que contenían 100 ml de solución salina isotónica con 600 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de cloranfenicol, 100 µg/ml de estreptomicina y 500 µg/ml de cicloheximida.
- 2) La suspensión obtenida fue agitada en vórtex durante un minuto.
- 3) Se agregaron 20 ml de aceite mineral estéril en cada frasco.
- 4) Se dejó reposar en heladera durante 24 horas.
- 5) Se obtuvo material de la interfase aceite-agua para efectuar la siembra y la inoculación en animales.

#### **Siembra:**

Se tomaron con micropipeta (Genex Beta) y utilizando tips estériles 10 µl de la interfase aceite-agua de cada muestra. Se sembraron en una placa de agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol (ASG) y en una placa de Agar Mycosel® (Agar dextrosa con cicloheximida y cloranfenicol, MYC). La siembra se realizó utilizando la técnica de agotamiento de superficie.

Estos cultivos fueron incubados a 28 °C durante 4 semanas, y observados periódicamente.

#### **Inoculación en ratones:**

Se inocularon ratones por vía intraperitoneal con 500 µl del material obtenido de la interfase aceite-agua con jeringa de tuberculina. Estos ratones pertenecían a la cepa CF1, machos de aproximadamente 60-70 días. Posteriormente, se dejó a estos animales en jaulas separadas, con comida y bebida *ad libitum*.

Se utilizaron además 2 ratones testigos positivos, a los cuales se les inoculó por vía intraperitoneal 500 µl de una suspensión de *H. capsulatum*, a partir de un tubo de

agar Sabouraud con la fase micelial de dicho hongo. La cepa de *H. capsulatum* que se utilizó para los ratones testigos, fue la aislada en un paciente (como se describe más adelante).

Al cabo de 50 días se sacrificaron los animales y se procesaron sus vísceras. También se recolectaron muestras de sangre para estudios serológicos. Se efectuaron siembras por separado de fragmentos de hígado, pulmón y bazo en tubos con ASG y MYC. Se incubaron en estufa a 28 °C durante 4 semanas y fueron observados periódicamente.

De los tejidos procesados se realizaron improntas, para la búsqueda de levaduras intracelulares compatibles con *H. capsulatum* utilizando la coloración de Giemsa. Además se preservaron en frascos con formol para estudios histopatológicos. Para los mismos, se utilizó un procesador de tejidos Microm STP 120 y un micrótopo Leica RM 2145. Se realizaron coloraciones de PAS.

Todos los procedimientos con ratones fueron realizados en el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (DBByF) de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Para poder realizar la experiencia, fue necesario obtener un aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de dicho departamento. El CICUAE se adapta a los Principios Éticos Internacionales que guían la Investigación Biológica y Biomédica con Animales. (Anexo 1).

Los estudios histopatológicos fueron realizados en la Cátedra de Histología Humana de la Universidad Nacional del Sur, con la colaboración y supervisión de sus docentes.

### **Identificación de *H. capsulatum***

Todos los cultivos, tanto de muestras ambientales como de tejidos, fueron incubados en estufa a 28 °C durante 4 semanas; y observados periódicamente en búsqueda de

colonias algodonosas, de color blanco o pardo claro compatibles con *H. capsulatum*. De dichas colonias y respetando las normas de bioseguridad para el manejo de hongos patógenos en el laboratorio, se realizaron preparaciones con azul de lactofenol para la observación microscópica y búsqueda de los macroconidios tuberculados típicos de *H. capsulatum*.

Las colonias con tales características fueron transferidas a tubos de ASG para su identificación de acuerdo a las características morfológicas y la conversión a fase levaduriforme.

### **Conversión a fase levaduriforme**

Se utilizaron tubos de agar sangre con el agregado de 0,5 g/L de cisteína. Se realizaron repiques sucesivos e incubación a 37 °C hasta observar el desarrollo de las levaduras.

## **5.2 Encuesta epidemiológica con histoplasmina**

### **Población:**

Se estudiaron 237 pacientes atendidos en el Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero y/o en Unidades Sanitarias dependientes de la Secretaría de Salud de Bahía Blanca. Los mismos cumplieron con los criterios.

Para poder realizar este estudio se envió para su estudio y aprobación el protocolo de trabajo al Comité Institucional de Bioética e Investigación del Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero. (Anexo 2).

Se consideraron aquellos pacientes provenientes de:

- Consultorios externos de Neumonología
- Consultorio de Medicina Laboral

- Consultorios externos de Clínica Médica
- Sala de Clínica Médica ( Sala X)
- Unidades Sanitarias (Centro de Salud A. Menghini de Gral Daniel Cerri, Villa Bordeu, Centro de Salud L. Piñeiro y Noroeste).

**Criterios de inclusión:**

Pacientes que se atendieron en los servicios antes descritos, mayores de 18 años y que aceptaron participar del estudio, dando por escrito su consentimiento (Anexo 3). A todos se les completó en el momento del estudio una ficha con datos demográficos y epidemiológicos de interés. (Anexo 4).

**Criterios de exclusión:**

Pacientes embarazadas o en período de lactancia, menores de 18 años, con antecedentes de manifestaciones adversas frente a intradermorreacciones y todos aquellos que por razones psíquicas o físicas no pudieron dar su consentimiento por escrito.

**Criterios de eliminación:**

Pacientes que no asistieron a las 48 horas al Hospital para la lectura de la prueba intradérmica.

**Prueba cutánea con histoplasmina:**

Se realizaron con histoplasmina diluida 1/50 con solución fisiológica estéril y 0,3% de fenol como conservante. Se inyectaron 0,1 ml con jeringa de tuberculina, vía intradérmica en el antebrazo de los pacientes.

El antígeno fue obtenido por filtración del desarrollo de la fase filamentosa de *H. capsulatum* en medio líquido de asparagina-sales como se describe en la literatura<sup>100</sup>.

El reactivo utilizado, correspondió al lote L63, y fue provisto por el Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

La lectura de la intradermorreacción se realizó a las 48 horas, midiendo el halo de infiltrado e induración y se expresó en milímetros. Se consideró una prueba positiva cuando el diámetro era mayor o igual a 5 mm.

Al momento de la aplicación de la prueba intradérmica se les extrajo sangre para realizar serología en búsqueda de anticuerpos anti *H. capsulatum*.

### **Estudios serológicos:**

Se realizó la búsqueda de anticuerpos anti *H. capsulatum* por ID y CIE en los sueros de los pacientes cuyas intradermorreacciones fueron positivas.

Los estudios serológicos se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos ya publicados<sup>102,103</sup>. El antígeno empleado fue un extracto acuoso de la fase levaduriforme de *H. capsulatum* obtenido conforme a una técnica ya comunicada<sup>104</sup> y fue provisto por el Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Lote 2/14).

### **5.3 Aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas**

#### **Población:**

Durante el período en estudio se analizaron 46 muestras provenientes de 41 pacientes que cumplieron con los criterios. Las muestras que se procesaron fueron esputos (ES), lavados broncoalveolares (BAL), biopsias de ganglios, biopsias de pulmón, biopsias de piel, biopsias de úlceras, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo (LCR), médula ósea (MO) y sangre.

### **Criterios de inclusión:**

Pacientes mayores de 18 años que se atendieron de manera ambulatoria o se hallaban internados en el Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero de Bahía Blanca y que por sus manifestaciones clínicas y/o enfermedades de base los profesionales médicos consideraron necesario descartar o diagnosticar una infección por *H. capsulatum*. Se incluyó a aquellos que aceptaron participar en el estudio dando su consentimiento por escrito. (Anexo 5).

### **Criterios de exclusión:**

Pacientes que por razones físicas o psíquicas no pudieron dar su consentimiento por escrito.

### **Procesamiento de las muestras**

Se recibieron en el laboratorio las muestras obtenidas de los pacientes que cumplieron con los criterios antes descriptos. Se completó una planilla por paciente con el fin de obtener datos clínicos y epidemiológicos que orientaran al diagnóstico. (Anexo 6).

A todas las muestras, además del estudio micológico se les realizó la búsqueda de gérmenes comunes y micobacterias de acuerdo a la sospecha clínica y a la prescripción médica. Fueron sembradas además de los medios de cultivo para hongos en: Agar sangre (AS), agar chocolate (ACH), Lowenstein-Jensen (LWJ), Stonebrink (ST) y medios de cultivo líquidos para micobacterias (MGIT).

Se realizaron coloraciones de Giemsa, Gram, Ziehl Neelsen y Kinyoun.

### **Materiales respiratorios :**

A los pacientes que se les solicitó estudio de ES, se les solicitó 3 muestras seriadas para aumentar la sensibilidad. Fueron sembrados por duplicado en tubos con ASG y

MYC e incubados a 28 °C y 37 °C por 4 semanas. Se realizaron coloraciones de Giemsa para la búsqueda de levaduras intracelulares.

#### **Líquidos de punción:**

Se sembraron en tubos con ASG, incubados a 28° C y 37° C por 4 semanas. Se realizaron coloraciones de Giemsa para la búsqueda del hongo.

#### **Hemocultivos:**

Para la búsqueda de *H. capsulatum* en sangre se utilizaron las botellas con agentes líticos *Bactec Myco/f-Lytic*<sup>®</sup> (BD). Las muestras se procesaron en el equipo automatizado BACTEC 9120 (BD).

#### **Mielocultivos:**

La punción-aspiración de médula ósea fue procesada en botellas con agentes líticos *Bactec Myco/f -Lytic*<sup>®</sup> (BD). También se sembraron por duplicado en tubos de ASG y fueron incubados a 28 °C y 37 °C por 4 semanas. Se realizaron coloraciones de Giemsa.

#### **Biopsias:**

Las biopsias se recibieron en frascos estériles con solución fisiológica. Se procesaron los tejidos en placas de Petri con bisturí, y se sembraron por duplicado en ASG. Se incubaron a 28 °C y 37 °C durante 4 semanas. Se realizaron coloraciones de Giemsa.

#### **Identificación de *H. capsulatum*:**

Se procedió de igual manera que en la descrita en la sección 5.1 Búsqueda de *H.capsulatum* a partir de reservorios ambientales.

### **Estudios serológicos**

A los pacientes en los cuales se aisló *H. capsulatum* se les realizó la búsqueda de anticuerpos por ID y CIE, de igual manera que la descripta en la sección 5.2.

### **Análisis estadístico:**

Para el estudio descriptivo, se calcularon las medidas de resumen y dispersión con sus respectivos IC 95%. Para analizar diferencias de proporciones se aplicó la Prueba de Chi Cuadrado. Se utilizó el programa estadístico Epiinfo versión 3.5.4

### **Marco ético:**

Este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero. Todos los pacientes fueron informados sobre el estudio y dieron su consentimiento por escrito. (Anexos 3 y 4).

### **Fuente de financiamiento:**

Se utilizaron los medios aportados por el Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero; por la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la UNS en el marco del PGI 24/ZB58 "Fuentes de infección de Histoplasmosis en la ciudad de Bahía Blanca", y por la propia investigadora.

### **Conflicto de intereses:**

No se presentó conflicto de intereses alguno por parte de la investigadora.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Búsqueda de *H. capsulatum* en posibles reservorios ambientales

Se recolectaron en total 48 muestras ambientales.

Se consideraron:

- a) 15 espacios abiertos, como plazas y parques donde se muestreó tierra cercana a árboles y palmeras, en algunos casos con excrementos de aves. Se incluyeron muestras de tierras cercanas a cursos de agua.
- b) 14 construcciones cerradas. En este caso se tomó de los lugares húmedos con presencia de plumas, excrementos y restos orgánicos.
- c) 19 espacios relacionados a hábitats de murciélagos y aves, donde se incluyeron gallineros, junta de separación de edificios y taparrollos de ventanas. Si bien existe en Bahía Blanca en la microcuenca hídrica del arroyo Saladillo de García un quiebre topográfico denominado Cueva de Los Leones, no pudo ser muestreado en esta oportunidad.

Las muestras fueron procesadas según se detalla en la sección 5.1. Los resultados de los cultivos de los diferentes lugares donde se tomaron las muestras para la búsqueda de *H. capsulatum* se indican en la Tabla 6.



**Figura 13.** Junta de separación de edificios. Barrio Vialidad de Ingeniero White.



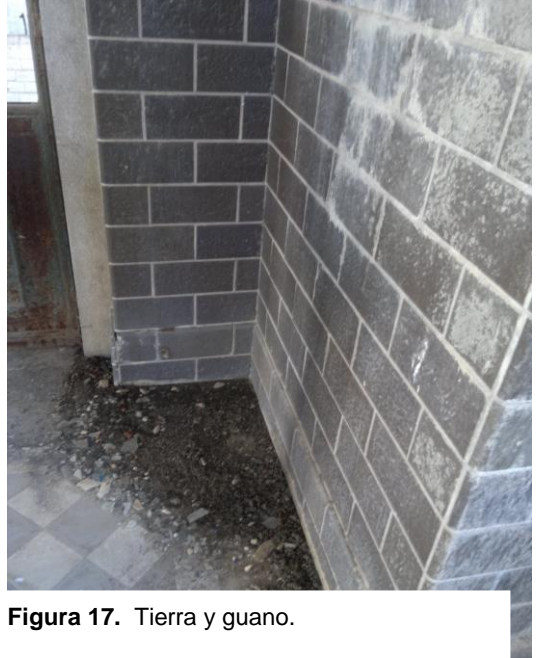
**Figura 14.** Tierra con guano y restos orgánicos.



**Figura 15.** ex Usina Gral. San Martín en Ingeniero White.



**Figura 16.** Interior de la Ex Usina.



**Figura 17.** Tierra y guano.



**Figura 18.** Lago en Parque de Mayo.

### **Inoculación en ratones:**

Además de la siembra en los medios de cultivos se inocularon por vía intraperitoneal 11 ratones como se describe en Materiales y Métodos, cada uno con una muestra ambiental. Se usaron 2 ratones para muestras provenientes de construcciones abandonadas, 2 para edificios públicos, 2 para galpones, 3 para juntas de separación de edificios, 1 para taparrollos y 1 para gallineros. Se incluyeron 2 ratones que fueron inoculados con una suspensión micelial de *H. capsulatum*. Después de 50 días fueron sacrificados, y sus vísceras procesadas como se detalló previamente. (Figuras 19 y 20).

Los cultivos de hígado, bazo y pulmón de los ratones inoculados con las muestras ambientales fueron todos negativos.

El cultivo correspondiente al bazo del ratón testigo 1 desarrolló al cabo de 15 días una colonia blanquecina, filamentosa de lento crecimiento (Figura 21). Al microscopio se observaron hifas hialinas, microconidios lisos, redondos y algunos piriformes y macroconidias que al principio eran de superficie lisa y más tardíamente (cerca de los 21 días) mostraron el aspecto tuberculado típico de *H. capsulatum*.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de los cultivos y los estudios serológicos correspondientes a los ratones inoculados. Las serologías fueron todas negativas, incluso las de los ratones testigo (Tabla 7).

Los tejidos conservados en formol, fueron procesados y posteriormente se realizaron cortes de 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor. Se realizaron coloraciones de PAS. No se observaron levaduras PAS positivas en los cortes estudiados.

**Tabla 6.** Resultados de los cultivos ambientales y cultivo de los 11 ratones inoculados con las muestras ambientales con sus estudios serológicos.

Lugares de muestreo	N° de muestras	Cultivo en ASG y MYC	Inoculación en ratones	Cultivo de hígado/bazo/pulmón de ratones en ASG y MYC	ID	CIE
<b>Espacios Abiertos</b>						
Plazas	6	ND <sup>1</sup>	-	NEGATIVO	-	-
Parques	3	ND	-	NEGATIVO	-	-
Tierras sobre cursos de agua	6	ND	-	NEGATIVO	-	-
<b>Espacios cerrados</b>						
Construcciones abandonadas	8	ND	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Edificios públicos	2	ND	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Galpones	4	ND	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
<b>Relacionados a murciélagos y aves</b>						
Juntas de separación de edificios	7	ND	3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Taparrollos	6	ND	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Gallineros domésticos	6	ND	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

ND<sup>1</sup> : No se observó desarrollo de *H. capsulatum* a los 30 días de incubación, ASG: Agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol; MYC: Agar Mycosel<sup>®</sup>.

**Tabla 7.** Resultados de los cultivos y los estudios serológicos de los ratones inoculados con *H. capsulatum*.

Ratones Testigo	Cultivo en ASG y MYC			ID	CIE
	Hígado	Pulmón	Bazo		
I	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo
II	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

ASG: Agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol; MYC: Agar Mycosel<sup>®</sup>



**Figura 19.** Inoculación intraperitoneal en ratones.



**Figura 20.** Después de los 50 días se sacrificaron los ratones y se extrajeron hígado, pulmón y bazo.



**Figura 21.** Desarrollo en ASG de *H.capsulatum* a partir del bazo del ratón testigo 1.

## 6.2 Encuesta epidemiológica con histoplasmina

Se realizaron un total de 265 intradermorreacciones con histoplasmina.

Las pruebas cutáneas fueron aplicadas en el Laboratorio Central del Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero o en las Unidad Sanitarias, previo consentimiento informado del paciente. Después de la aplicación de la prueba cutánea, se citó a los pacientes a las 48 h para la lectura de la misma.

Del total de pacientes, 28 fueron eliminados ya que no asistieron al Laboratorio para la lectura de la intradermorreacción.

De los 237 pacientes estudiados, 122 fueron mujeres (51,5%) y 115 varones (48,5%). Las edades estuvieron comprendidas entre 18 y 84 años; con una media de  $43,5 \pm 14,8$  años; una mediana de 44 años y una moda de 32.

Los pacientes consultaron en diferentes centros de atención médica: en Unidades Sanitarias, distribuidas en la ciudad (Gral. Daniel Cerri, Villa Bordeu, Noroeste, Piñeiro); en Consultorios Externos (Neumonología, Medicina Laboral y Clínica Médica) y otros fueron atendidos en la Sala de Internación de Clínica Médica del Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero.

La prevalencia de intradermorreacciones positivas para la histoplasmina en la población general fue de 13,9% con un IC 95% [9,8-19]. No hubo diferencias significativas en cuanto a género para la positividad de la reacción, siendo de 12,3% para los hombres y 14,7% para las mujeres.

Los resultados positivos a la intradermorreacción con histoplasmina se asociaron significativamente con los pacientes que se atendieron en los Consultorios Externos de Neumonología con  $p < 0,00004$ , OR=5,50 [2,09-14,41]. (Tabla 8).

En cuanto a las ocupaciones o trabajos de los pacientes se los agrupó por tipo de tareas que desarrollaban, el grupo más numeroso fue el de empleados de comercio o

empresas. Esto se debe a que la ciudad de Bahía Blanca posee una gran estructura productiva de comercios y un sector industrial dinámico y en expansión.

A los pacientes se los agrupó por rangos de edad. Las edades de los pacientes con histoplasminas positivas estuvieron comprendidas entre los 25 a 74 años, con una media de 48,7 años.

Se encontró que el grupo de pacientes de edades comprendidas entre 49 y 58 años se asoció significativamente con resultados positivos a la intradermoreacción de histoplasmina, con  $p < 0,000004$  OR= 5,42 [2,34-12,59].

La mayoría de los pacientes (80,2%) residían hace más de 21 años en la ciudad. De los 33 pacientes con histoplasmina positivas el 78,8% pertenecían a este grupo.

Más de la mitad de los pacientes (67,5%) no tenían enfermedad de base en el momento de la aplicación de la histoplasmina. La más frecuente fue la patología respiratoria (asma, EPOC, tos crónica, bronquiectasias, abscesos pulmonares, tuberculosis). Se asoció significativamente la presencia de algún tipo de patología respiratoria con histoplasminas positivas, con  $p < 0,003$ .

Otras enfermedades de base fueron hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipo e hipertiroidismo, hipercolesterolemia, epilepsia, que fueron agrupadas bajo la categoría de "otras". (Tabla 9).

**Tabla 8** Distribución de los pacientes según el área de Salud donde fueron atendidos

<b>ORIGEN</b>	<b>PACIENTES n=237</b>	<b>HISTOPLASMINAS POSITIVAS (%)</b>
Consultorios Externos de Clínica Médica	29	5 (17.2)
Consultorios Externos de Neumonología	28	11 <sup>a</sup> (39,3)
Consultorio de Medicina Laboral	88	5 (5,7)
Unidad Sanitaria Gral. Daniel Cerri	20	2 (10)
Unidad Sanitaria Villa Bordeu	6	1 (16,7)
Unidad Sanitaria Noroeste	2	0
Centro de Salud L. Piñeiro	53	9 (17)
Sala X (Clínica Médica)	11	0

<sup>a</sup>p < 0,00004

**Tabla 9.** Características de la población estudiada

<b>Población estudiada</b>	<b>Número (%)</b>	<b>Histoplasmina Positiva (%)</b>
<b>GENERO</b>		
Masculino	115 (51,5)	15 (12,3)
Femenino	122 (48,5)	18 (14,7)
<b>EDAD</b>		
18-28 años	42 (17,7)	2 (4,8)
29-38 años	57 (24,0)	4 (7,0)
39-48 años	42 (17,7)	5 (11,9)
49-58 años	55 (23,2)	18 <sup>a</sup> (32,7)
>59 años	41(17,3)	4 (12,2)
<b>OCUPACION</b>		
Trabajadores de la construcción	18 (7,6)	4 (22,0)
Trabajadores rurales	5 (2,1)	2 (40,0)
Amas de casa / Empleadas domésticas/ Cuidado de Personas	74 (31,2)	12 (16,0)
Empleados de comercio / Empresas / Fábricas / Administrativos	87 (36,7)	11(12,6)
Choferes	20 (8,4)	2 (10,0)
Trabajadores de la Salud	11 (4,6)	2 (18,0)
Otras ocupaciones	16 (6,7)	0 (0)
<b>ENFERMEDAD DE BASE</b>		
Respiratoria	28 (11,8)	9 <sup>b</sup> (32,0)
Autoinmune	1 ( 0,4)	0 (0)
Oncológica	2 (0,8)	0 (0)
Otras	46 (19,4)	5 (10,8)
Sin Enfermedad de Base	160 (67,5)	19 (11,8)
<b>AÑOS DE RESIDENCIA EN BAHIA BLANCA</b>		
<b>0-10</b>	15 (6,3)	5 (33)
<b>11-20</b>	32 (13,5)	2 (6,2)
<b>&gt;21</b>	190 (80,2)	26 (13,7)

<sup>a</sup> $p < 0,000004$ ; <sup>b</sup> $p < 0,003$

### **Estudios serológicos:**

A los 33 pacientes cuyas intradermorreacciones de histoplasmina fueron positivas, se les estudio la presencia de AC por ID y CIE, siendo negativa en todos los casos.



**Figuras 22 y 23. Intradermorreacciones positivas a la histoplasmina**

### **6.3 Aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas**

En el período de estudio se evaluaron 41 pacientes de los cuales 17 (41,5%) eran hombres y 24 (58,5%) mujeres.

Los mismos fueron atendidos en alguna de las siguientes áreas del Hospital: Consultorios de Neumonología, Consultorio de Infectología, Sala de Internación de Clínica Médica o Unidad de Cuidados Intensivos. Se procesaron en total 46 muestras. (Tabla 10).

Con respecto a las enfermedades de base de los pacientes el 21,9% estaban infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el 17,2% tenían algún otro grado de inmunocompromiso, ya sea por tratamientos crónicos con corticoides o por inmunodeficiencias primarias. Un 39% de los pacientes estaba atravesando un proceso neoplásico ya sea onco-hematológico o de tumores sólidos; y el 21,9% manifestó signos y síntomas de origen respiratorio.

En el 71,7% de las muestras procesadas se obtuvieron cultivos negativos; es decir no desarrollaron bacterias ni hongos. En el 8,7% de las muestras se obtuvieron coloraciones para BAAR positivas; en un 13% el cultivo fue bacteriano y en un 8,7% la

etiología de la infección fue de origen fúngica. Hubo un aislamiento mixto, donde se aisló *Klebsiella pneumoniae* asociada a *Pneumocystis jirovecii*. (Tabla 11).

En un solo paciente se aisló *H. capsulatum* a partir de los hemocultivos y de un lavado broncoalveolar. (Figuras 24 y 25). Este paciente era un hombre de 56 años de edad y estaba internado en la Sala de Clínica Médica. Ex tabaquista, enolista crónico y en situación de calle ingresó al hospital por un síndrome de repercusión general de seis meses de evolución. Presentaba disnea, equivalentes febriles y tos. Se realizó el diagnóstico de infección por VIH durante su internación, el recuento de CD4<sup>+</sup> fue de 38/μl. El hemograma mostraba anemia y leucopenia.

No se pudo realizar la búsqueda de AC en el suero del paciente, ni la aplicación de la intradermorreacción con histoplasmina.

La tomografía computarizada de tórax evidenció adenopatías hiliares bilaterales, lesiones nodulares centrilobulares de contornos definidos. Presentó lesiones cutáneas y si bien no se realizó la escarificación de las mismas, se envió un punch cutáneo al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital. Los cortes histológicos revelaron piel con estructura folicular dilatada ocupada por demodex y levaduras PAS positivas.

Con respecto a la epidemiología del paciente, era nacido en la ciudad de Bahía Blanca y refirió haber vivido siempre en el mismo lugar. Hacía 15 años había realizado trabajos como empleado rural en establecimientos de la zona.

La búsqueda y el aislamiento de *H. capsulatum* a partir de los hemocultivos y BAL se realizó según está detallado en la sección 5.3 de Materiales y Métodos.

Después de aproximadamente 10 días se observó desarrollo de unas colonias blanquecinas, algodonosas, de lento crecimiento. Se realizaron los exámenes en fresco con azul de lactofenol y se apreciaron hifas hialinas, escasos microconidios redondos y piriformes y escasos macroconidios redondos de superficie lisa. A los 20

días de incubación las colonias eran de color canela, había difundido un pigmento marrón al medio de cultivo, y al microscopio se observaron abundantes macroconidios redondos tuberculados típicos de *H. capsulatum*.

Se realizó la conversión a fase levaduriforme, utilizando tubos de agar sangre con el agregado de cisteína e incubados a 37 °C. Después del cuarto repique se observó desarrollo de colonias levaduriformes. Al microscopio se observó la presencia de abundantes levaduras pequeñas y de fragmentos de hifas hialinas (Figuras 26-31). En las Figuras 32-35 se muestran fotografías tomadas con microscopía electrónica de barrido de la cepa de *H. capsulatum* aislada del paciente.

No se realizó la prueba de exoantígenos al presentar la cepa la fructificación característica y dar positiva la conversión a la fase levaduriforme.

Queda pendiente la identificación y caracterización molecular en el Instituto ANLIS Malbrán.

La fase micelial del *H. capsulatum* de este aislamiento se utilizó como control positivo inoculándose en los ratones testigos 1 y 2. Como se indicó, se logró re aislarlo nuevamente a partir del bazo de uno de los ratones testigo.

**Tabla 10.** Distribución de las muestras clínicas en las cuales se investigó la presencia de *H. capsulatum*.

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Procesadas</b>
M.O	4
SANGRE	9
BAL / ESPUTO / LÍQUIDO PLEURAL	14
GANGLIOS	8
BIOPSIA PIEL	2
BIOPSIAS ULCERAS CAVIDAD ORAL	5
BIOPSIA PULMÓN	2
LCR	2
<b>Total</b>	<b>46</b>

**Tabla 11.** Enfermedad de base, materiales clínicos y resultados de los cultivos de los pacientes estudiados.

Paciente	ENFERMEDAD DE BASE/Signos	Material clínico	Cultivo Micológico	Cultivo bacteriano/BAAR
1	COLAGENOPATIA	BAL	NE	NE/NE
2	POLIANGEITIS MICROVASCULAR	Biopsia pulmón	NE	NE/NE
3	VIH+ / Adenopatías	Ganglio axilar	NE	NE/NE
4	VIH+/ sepsis	BAL / Sangre	<i>H. capsulatum</i>	NE/NE
5	VIH+/LINFOMA T ANGIOINMUNOBLASTICO	Ganglio inguinal	NE	NE/NE
6	TBC	BAL	NE	NE/BAAR +
7	LINFOMA NO HODKING A CELULAS GRANDES	BAL	NE	NE
8	VIH+ / Adenopatías	Ganglio	NE	NE
9	Adenopatía cervical/TBC ganglionar	Ganglio cervical	NE	BAAR+
10	Cavitación pulmonar	BAL	NE	NE
11	Cavitación pulmonar	ES	NE	NE
12	VIH+ /sepsis	Sangre	NE	NE
13	INMUNODEFICIENCIA 1° IDIOPATICA	Sangre	NE	NE
14	NEUMONIA DE LENTA RESOLUCION	Sangre	NE	<i>S. aureus</i>
15	CA PULMON NEUROENDÓCRINO DE CELULAS PEQUEÑAS	BAL	NE	NE
16	NEUMONIA grave en inmunocomprometida. Desnutrido crónico	Sangre	NE	<i>K. oxycytoa</i>
17	LINFADENITIS GRANULOMATOSA TBC ganglionar? <sup>1</sup>	MO/BAL/ Ganglio mediastinal	NE	NE
18	Nódulos pulmonares GRANULOMATOSIS DE WEGNER ANCAc +	Sangre	NE	NE
19	VIH+	BAL	<i>P. jiroveci</i>	<i>K. pneumoniae</i>
20	LEUCEMIA PROMIELOCITICA	Biopsia tabique nasal	NE	NE
21	LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA + SEPSIS	Biopsia úlceras bucales/ Biopsia piel/Sangre	NE	NE
22	CANCER PULMON	ES	NE	<i>Nocardia sp</i>
23	METASTASIS PULMON, HUESO, HIGADO, BAZO.	MO	NE	NE
24	LINFOMA	Biopsia úlcera paladar	NE	NE
25	Bronquiectasias	ES	NE	NE/BAAR + <i>M. intracellulare</i>
26	LINFOMA	Biopsia senos paranasales	NE	<i>Nocardia sp</i>
27	NEUMONIA de lenta resolución	BAL	NE	NE
28	LEUCEMIA DE CELULAS DENDRITICAS	Sangre	NE	NE

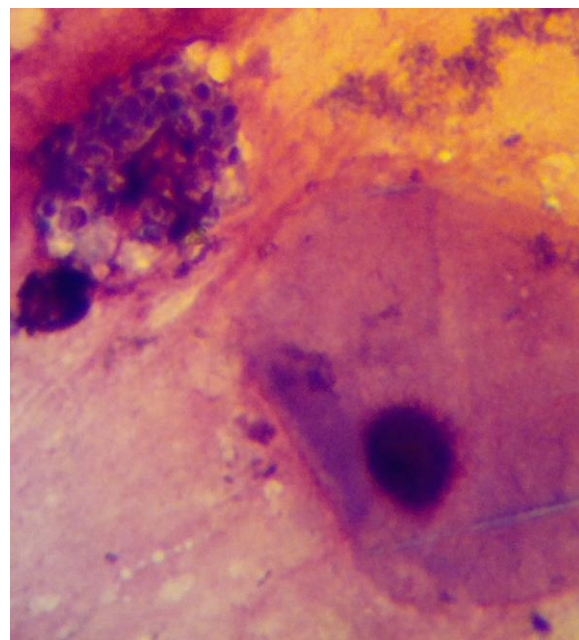
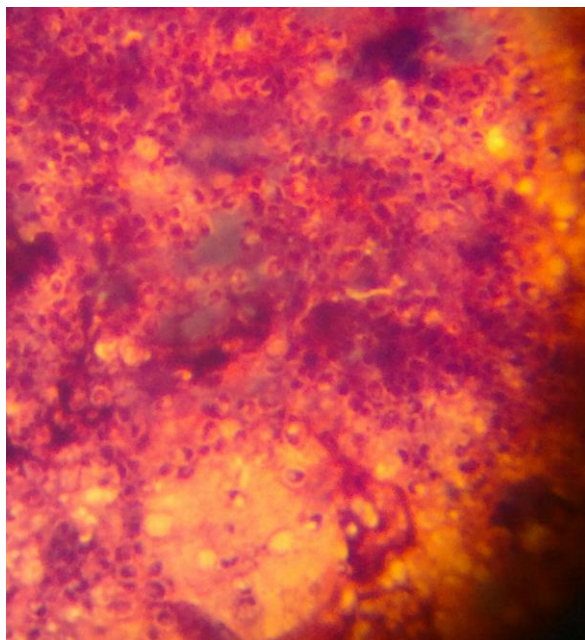
Continuación **Tabla 11**

29	LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS	Sangre	<i>C. albicans</i>	NE
30	LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA	Biopsia de piel	NE	NE
31	VIH +	ES	NE	BAAR+
32	VIH+	LCR	<i>C. neoformans</i>	NE
33	LEUCEMIA MIELOCITICA AGUDA	MO/Biopsia de lengua	NE	NE
34	ADENOCARCINOMA	Liquido pleural	NE	NE
35	LINFOMA HODKING	Ganglio mediastinal	NE	NE
36	METASTASIS CARCINOMA 1° INDIFERENCIADO	Ganglio mediastinal	NE	NE
37	ARTRITIS REUMATOIDEA	MO	NE	NE
38	ESPONDILITIS ANQUILOSANTE	BAL	NE	<i>Rhizobium radiobacter</i>
39	VIH+	LCR	NE	NE
40	SINDROME HIPEREOSINOFILICO Nódulos pulmonares	Biopsia pulmón	NE	NE
41	CARCINOMA NEUROENDOCRINO DE PULMÓN	Ganglio mediastinal	NE	NE

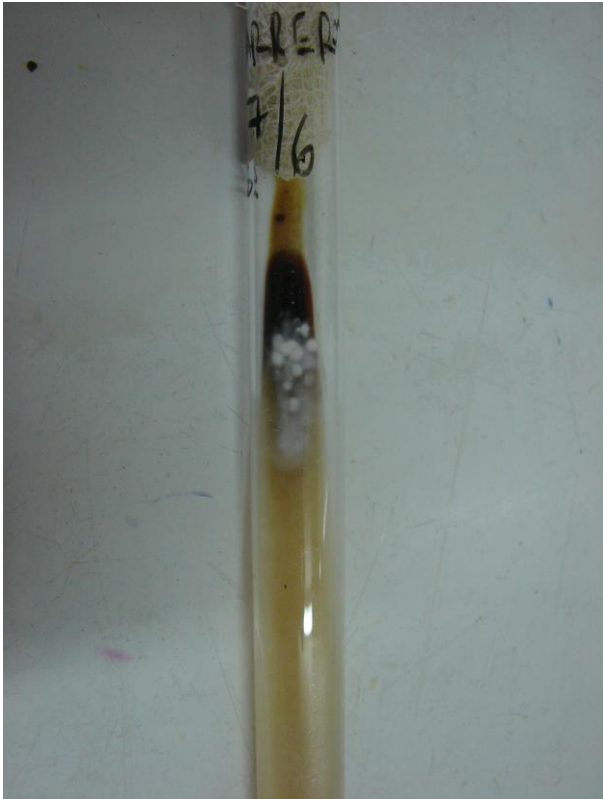
NE: Cultivo Negativo

BAAR+: Bacilos ácido alcohol resistentes (Coloración de **Ziehl Neelsen positiva**)

<sup>1</sup> Paciente sin diagnóstico confirmado microbiológicamente, en tratamiento empírico para tuberculosis ganglionar, TBC: Tuberculosis



**Figuras 24 y 25.** Levaduras intracelulares de *H. capsulatum* en BAL coloreado con Giemsa.



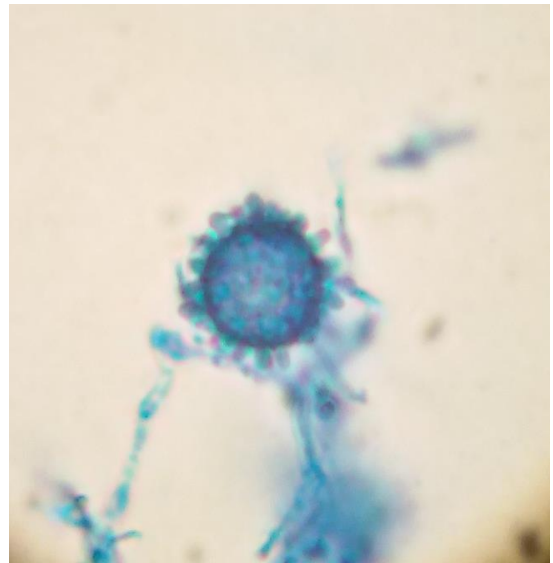
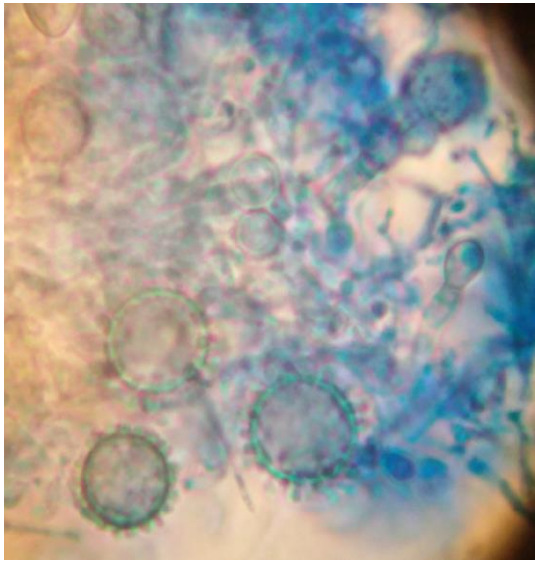
**Figura 26.** *H. capsulatum* colonias blanquecinas a los 10 días de incubación.



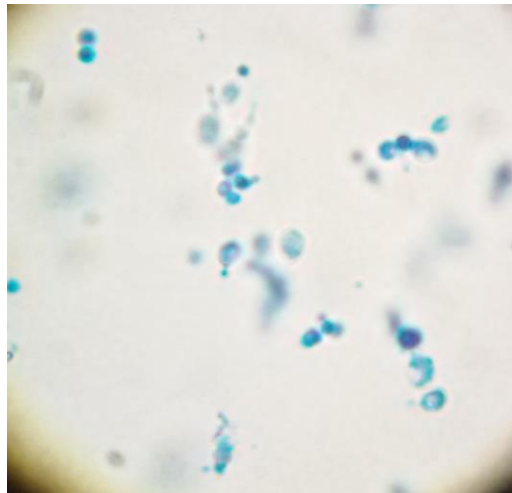
**Figura 27.** *H. capsulatum* colonias a los 21 días de incubación.



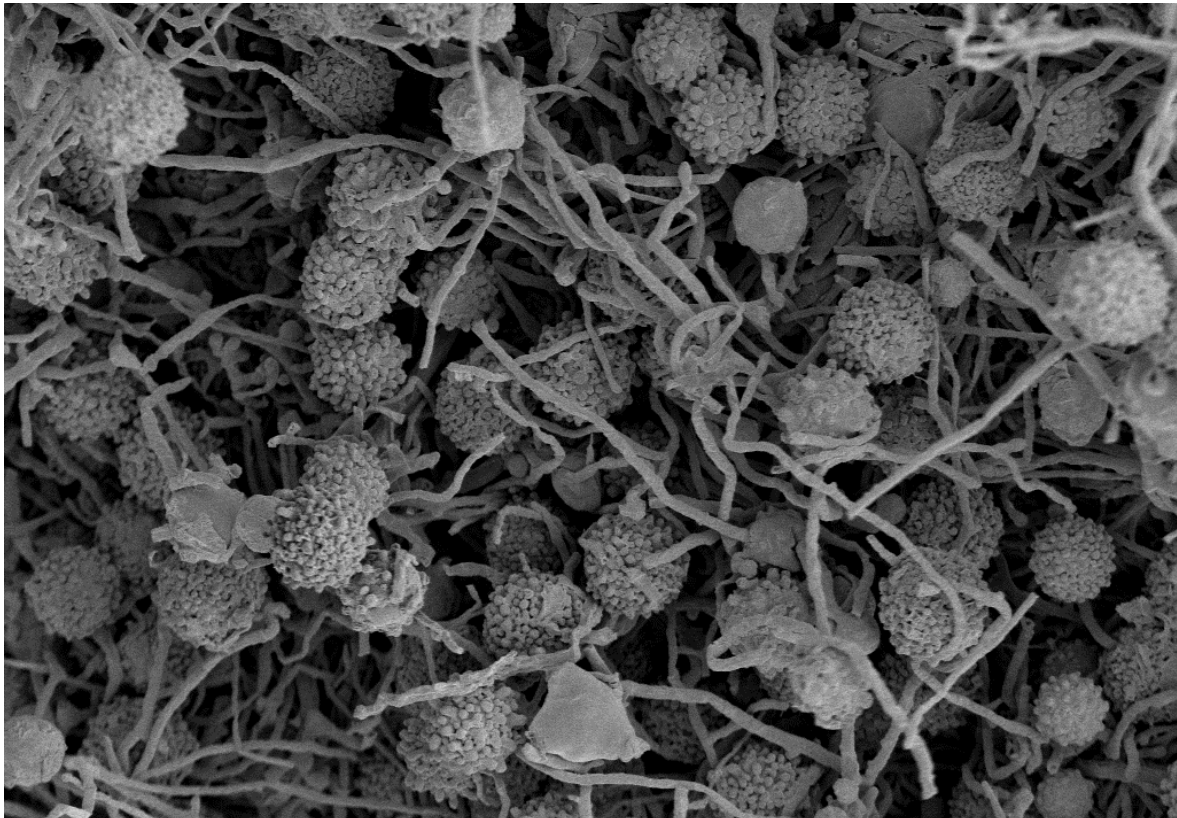
**Figura 28.** Fase levaduriforme de *H. capsulatum* en Agar Sangre con cisteína.



**Figuras 29 y 30.** Hifas y macroconidias de *H. capsulatum* (100X)

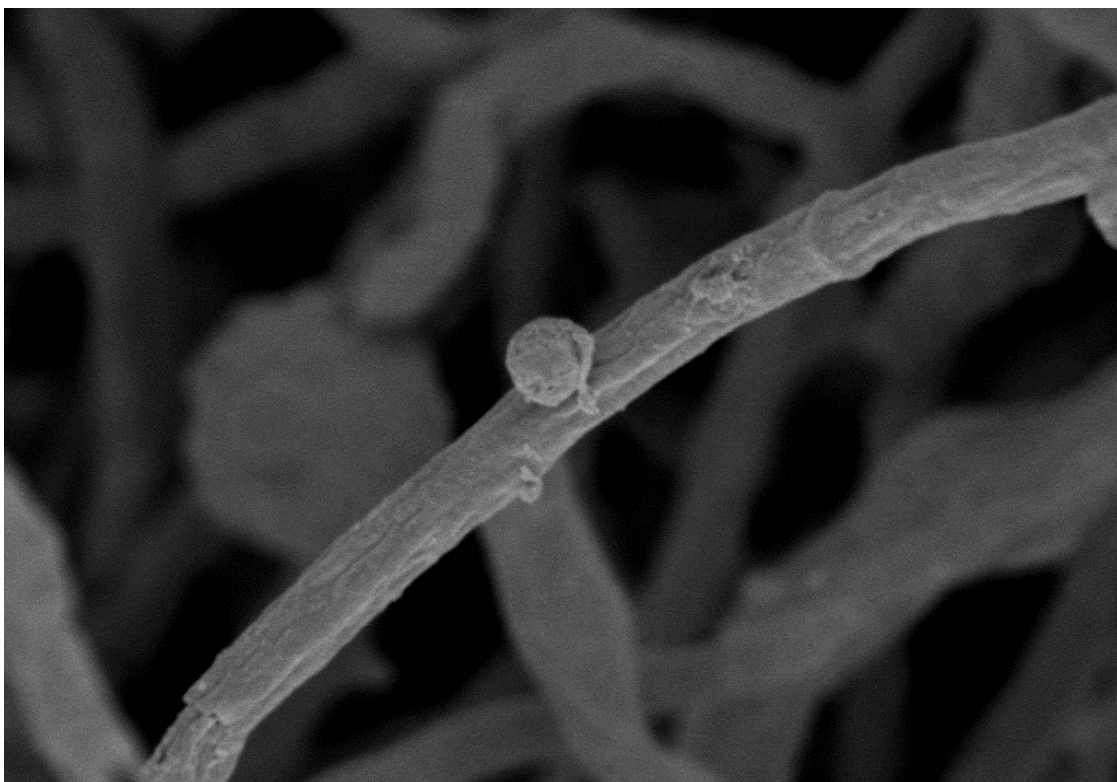


**Figura 31.** Células levaduriformes de *H. capsulatum*. (100X)



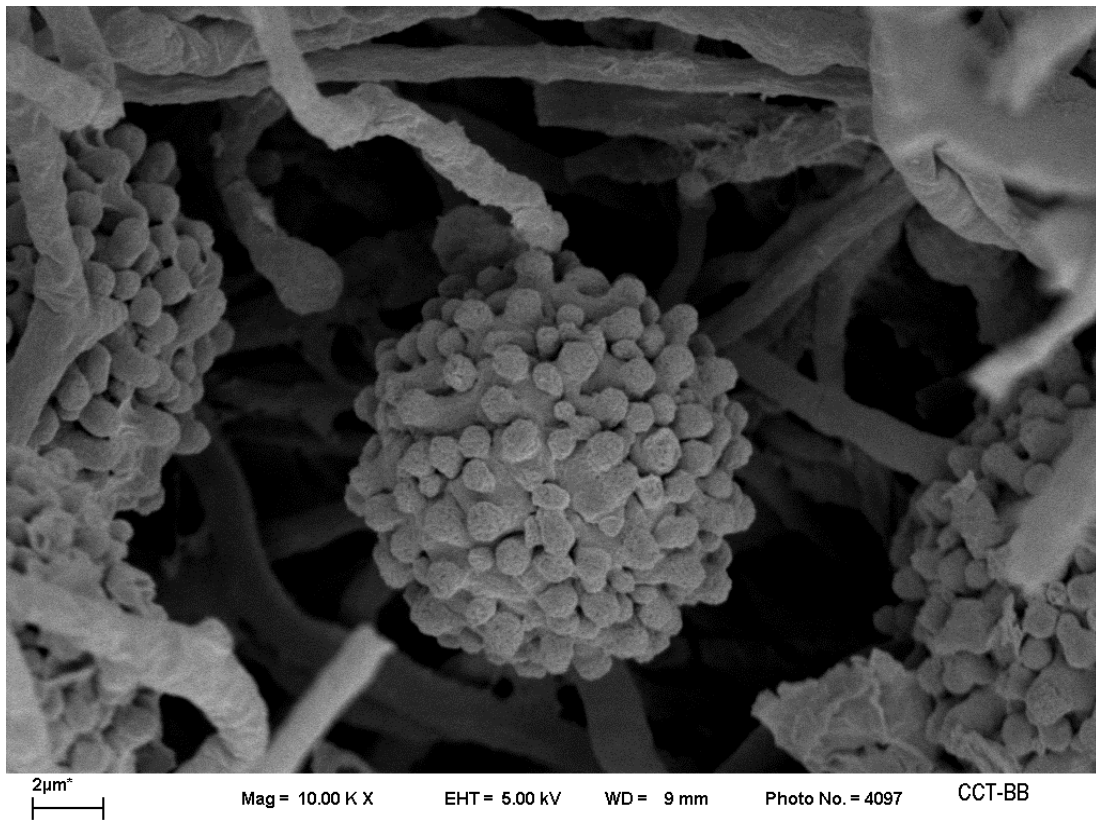
20µm<sup>+</sup> Mag = 2.00 K X EHT = 5.00 kV WD = 9 mm Photo No. = 4096 CCT-BB

**Figura 32.** Hifas y macroconidios tuberculados de *H. capsulatum*.

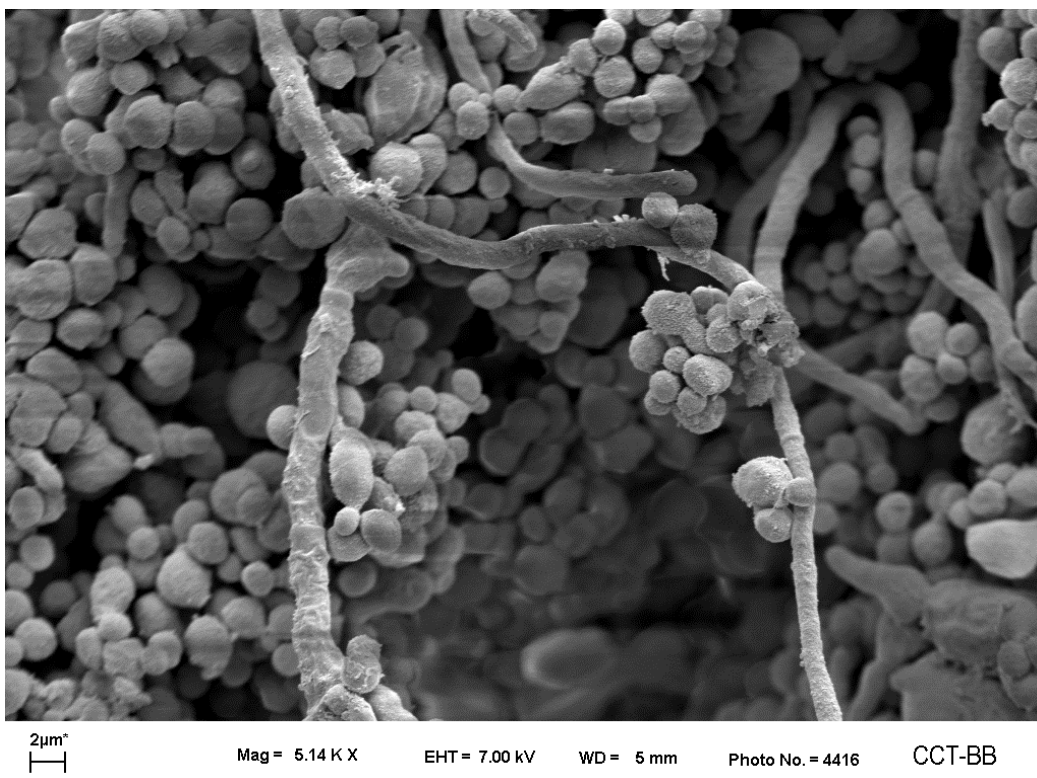


2µm<sup>+</sup> Mag = 20.00 K X EHT = 5.00 kV WD = 7 mm Photo No. = 4100 CCT-BB

**Figura 33.** Hifa tabicada y microconidio de *H. capsulatum*.



**Figura 34.** Macroconidio tuberculado de *H. capsulatum*.



**I Figura 35.** Transición de la fase saprofítica de *H. capsulatum* a la de levadura. Mezcla de hifas en conversión y levaduras.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Búsqueda de *H. capsulatum* en reservorios ambientales

Se sabe que la fase micelial infectante del hongo crece en lugares oscuros y húmedos, y su presencia ha sido documentada en sótanos, construcciones viejas, galpones, cuevas, gallineros, asociados a excretas de aves y murciélagos. La disrupción del suelo que contiene excrementos de aves o murciélagos es una forma de generar aerosoles y exponer al ser humano a los elementos infectantes del hongo.

Existe una importante cantidad de comunicaciones que documentan brotes adquiridos por exposición laboral asociados con tareas de construcción y actividades de remodelación de áreas<sup>12, 30, 33, 38, 39,41</sup>. Por ello, las personas que trabajan en la construcción, excavación y remodelación, o realizan actividades como espeleología o viajeros a áreas endémicas pueden ponerse en contacto estrecho con aerosoles contaminados y tienen riesgo de desarrollar la infección por el hongo.

Como se observa en la Tabla 6, en este trabajo no se logró aislar *H. capsulatum* a partir de las muestras ambientales estudiadas.

Uno de los factores a tener en cuenta es que la búsqueda del hongo no se realizó a partir de un brote de histoplasmosis, es decir no estuvo dirigida a determinados lugares geográficos sino que fue “a ciegas”, investigando en diferentes reservorios donde se vincula la presencia de *H. capsulatum* en la bibliografía. Seguramente será necesario emprender una búsqueda más intensa, muestreando en mayor cantidad de lugares para lograr el aislamiento del hongo.

Otro factor a considerar es que no se logró disponer de la suficiente cantidad de animales de experimentación (ratones) en el tiempo de estudio. El Bioterio de la Universidad Nacional del Sur provee animales para ser utilizados en varios trabajos de investigación y docencia de la Universidad y de otras instituciones de la ciudad; fue un limitante para poder trabajar con más animales, el espacio físico y la atención

profesional de este ámbito. Además no se pudo trabajar con hámsteres, animales ideales para la búsqueda de *H.capsulatum*, ya que se comportan con inmunosuprimidos frente a la inoculación de los elementos infectantes del hongo.

Los estudios serológicos que se realizaron en los ratones fueron todos negativos, tanto por ID como por CIE. También fue negativa la serología de los ratones testigos, incluso la del ratón testigo I en el cual se aisló a partir del cultivo del bazo, *H. capsulatum*.

Si bien la sensibilidad de los estudios serológicos dependen de la forma clínica de la micosis, la CIE posee mayor sensibilidad que la ID. No obstante, ambas técnicas presentan limitaciones entre las que se encuentra el tiempo necesario para que se produzcan los anticuerpos. Los ratones fueron sacrificados 50 días después de la inoculación de los elementos infectantes. A pesar de que el tiempo fue mayor a las 6 semanas requeridas para la producción de anticuerpos, este puede haber sido un factor a tener en cuenta para interpretar los estudios serológicos negativos.

## **7.2 Encuesta epidemiológica con histoplasmina**

La histoplasmosis en Argentina no es de denuncia obligatoria, por lo cual no existen registros claros y unificados sobre la real incidencia de esta micosis en nuestro país.

Los individuos que han sido infectados por *H. capsulatum* desarrollan un estado de hipersensibilidad retardada, el cual se pone de manifiesto mediante la aplicación de la prueba intradérmica de histoplasmina.

Las tasas de infección varían según las áreas geográficas entre 15-73% <sup>100</sup>.

En este trabajo se obtiene una tasa de infección global del 13,9%, sin ser significativa la diferencia en cuanto a género. Aunque la reactividad a la prueba cutánea con

histoplasmina se distribuye de igual manera entre hombres y mujeres, la micosis es más frecuente en hombres en una proporción 4:1.<sup>59</sup>

Si bien la mayoría de los pacientes encuestados vivía hace muchos años en la ciudad (más de 21 años el 80,2% de la población); hay que tener en cuenta los continuos movimientos migratorios incluso los de corto período de tiempo como vacaciones o viajes. Esto hace que la población estudiada no sea una población estática sino dinámica, que seguramente a pesar de residir en la ciudad ha viajado a otros lugares.

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre los pacientes atendidos en los Consultorios de Neumonología e intradermorreacciones positivas a la histoplasmina. También hubo asociación significativa entre resultados positivos y pacientes cuyas edades estaban comprendidas entre 49 y 58 años. Se conoce que en los pacientes con enfermedad obstructiva pulmonar crónica, por lo habitual varones, mayores de 50 años, grandes fumadores y de raza blanca, la infección pulmonar primaria no cura espontáneamente, puede generar focos de neumonitis crónica intersticial, y conducir a un cuadro clínico similar a la tuberculosis crónica excavada<sup>105</sup>.

No se encontró asociación entre histoplasminas positivas y ocupación de los pacientes. Esto se debe a que un gran porcentaje de los pacientes desempeñaban tareas en comercios o empresas (36,7%) o eran amas de casa (31,2%) en zonas urbanas de la ciudad, lejos de posibles focos de infección. Solo el 7,6% eran trabajadores de la construcción y el 2,1% empleados rurales, desempeñando tareas con las cuales se vincula al hongo en la bibliografía.

La búsqueda de anticuerpos por ID y CIE fue negativa en todos los pacientes con intradermorreacciones positivas a la histoplasmina. Esto indica contacto previo aunque no reciente con *H. capsulatum*, ya que mientras la respuesta celular puede permanecer positiva de por vida, generalmente los anticuerpos formados desaparecen antes de los 3 años después de la infección.

### **7.3 Aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas**

Se analizaron 46 muestras clínicas provenientes de 41 pacientes. Todos los pacientes tenían además de signos, síntomas o manifestaciones clínicas; algún factor de riesgo para una posible infección por *H. capsulatum*.

Entre los factores de riesgo se detallan: adultos mayores de 54 años, en especial del sexo masculino; enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diversos grados de compromiso de la inmunidad mediada por células; infectados por el VIH; recuento de CD4<sup>+</sup> <200/μl; portadores de leucemias linfáticas tratadas con drogas antiblásticas; diagnóstico de linfoma y en tratamiento con corticosteroides por tiempo prolongado<sup>58,</sup>

<sup>64</sup>.

Se logró aislar *H. capsulatum* a partir de hemocultivos y lavado broncoalveolar de un solo paciente. Este enfermo, masculino de 56 años presentaba una grave alteración en su inmunidad, ya que era VIH (+) con un recuento de 38 CD4<sup>+</sup> /μl. Ingresó al hospital después de un cuadro de meses de evolución, y desarrolló una histoplasmosis diseminada de curso fulminante.

Como se dijo anteriormente, el sida constituye el factor de riesgo más importante para la presentación de las formas diseminadas subagudas en América del Sur. Estas formas de presentación disminuyeron con el uso del tratamiento antirretroviral (TARGA). El paciente de este trabajo no estaba con terapia antirretroviral ya que se diagnosticó su infección por VIH estando internado en el Hospital.

Si bien el paciente era nacido en la ciudad de Bahía Blanca y actualmente residía en el lugar, en años anteriores había desarrollado tareas rurales en establecimientos de la zona. No se puede afirmar si su infección por *H. capsulatum* fue por una exposición actual o por una reactivación de una infección latente.

## 8. CONCLUSIONES

Con respecto a los objetivos específicos planteados:

- 1) No se aisló *H. capsulatum* en los posibles reservorios investigados.
- 2) Se encontró que un 13,9% de la población estudiada posee una intradermorreacción positiva a la histoplasmina; es decir estuvo en contacto con el hongo y desarrolló inmunidad mediada por células.
- 3) Se identificó un posible caso autóctono de infección por *H. capsulatum*.

Estos resultados no son concluyentes. Para completar el estudio y poder afirmar que Bahía Blanca es zona endémica para *H. capsulatum* se deberá continuar la búsqueda del hongo en el ambiente, investigando en una mayor cantidad de reservorios.

Asimismo se deberá continuar con las intradermorreacciones en la población y con la identificación de posibles casos autóctonos de infección por *H. capsulatum*.

Se propone continuar con la investigación en el tema, incorporando la búsqueda de la infección en animales, sobre todo domésticos que no hayan sufrido movimientos migratorios y que puedan confirmar el área endémica.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas Guzmán R. Micología Médica Ilustrada, 3ra edición. Mc Graw Hill 2008, capítulo 17, p. 190-199.
2. Bonifaz A. Micología Médica Básica, 4ta. edición. Mc Graw Hill 2012, capítulo 20, p. 279-296
3. Mitchel TG. Micosis sistémicas. En: Joklik WK, Willet HP, Bernard Amos D, editores. Zinsser Microbiología. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1983. p 1254-1261.
4. Darling ST. A protozoal general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen, and lymph nodes. J Amer Med Ass. 1906;46:1283-1285.
5. da Rocha-Lima H. Histoplasmosis und epizootische Lymphangitis. Arch SchiffsTropenhyg. 1912; 16:79.
6. DeMonbreun WA. The cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. Am J Trop Med Hyg. 1934; 14:93-125
7. Furcolow ML, Schubert J, Tosch FE, et al. Serologic evidence of histoplasmosis in sanitariums in the U.S. J Amer Med Ass. 1962; 180: 109-114.
8. Christie A. Histoplasmosis and pulmonary calcification. Ann NY Acad Sci. 1950; 50:1283-1289.
9. Ajello L. Distribution of *Histoplasma capsulatum* in the United States. In: Ajello L, Chick W, Furcolow MF, editors. Histoplasmosis. Springfield, Ill: Charles C Thomas; 1971: 103-122.
10. Kwon Chung KJ. Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. Science 1972; 475:325.
11. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 115-32.
12. Sánchez MA. Histoplasmosis, la micosis del viajero. Enf Inf Microbiol 2009; 29(3): 111-6.

13. Selim SA, Soliman R, Osman K, Padhye AA, Ajello L. Studies on histoplasmosis farciminosi (epizootic lymphangitis) in Egypt. Isolation of *Histoplasma farciminosum* from cases of histoplasmosis farciminosi in horses and its morphological characteristics.
14. Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length in a nuclear gen. J Clin Microbiol. 1992; 30: 2104-2107.
15. Karimi K, Wheat JL, Connolly P, Gretchen C, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in Histoplasmosis in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome in the United States and Brazil. J Infect Dis. 2002 Dec 1; 186(11): 1655-1660.
16. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mol Ecol. 2003. 12: 3383-3401.
17. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla del Valle M, Zuñiga G. 2005. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. FEMS Immunol Med Microbiol 45: 451-458.
18. Lacaz C da S, Porto E, Costa Martins E, Heins-Vaccari E, Takashio de Melo, N. Histoplasmosis Clássica. En: Lacaz C. da S. et al. editores. Tratado de Micología Médica. Ed. Sarvier. Sao Paulo 2002; 594-517.
19. Taylor ML, Reyes Montes MR, Martinez Rivera MA, Rodriguez Arellanes G, Duarte Escalante F, Flores Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. Ciencia y Desarrollo 1997; 136: 59-63.
20. San Blas G. Regulaciones bioquímicas en el dimorfismo y la virulencia de hongos patógenos para humanos. Acta Cient Venez 1992; 43:3-10.

21. Rippon JW. Medical Micology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3th Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1988:381-432.
22. Hearn VM. Structure and function of the fungal cell wall. En: Jacobs PH, Nall L editors. Fungal Diseases. Biology, inmunology, and diagnosis. New York: Marcel Kekker Inc; 1997: 27-60.
23. Eissenberg LG, Poirier S, Goldman, WE. Phenotypic variation and persistence of *Histoplasma capsulatum* yeast in host cells. Infect Immun. 1996; 64:5310-5314.
24. Lara-Lemus R, Alvarado-Vázquez N, Zenteno E, Gorocica P. Efecto de los glucanos de *Histoplasma capsulatum* sobre la inmunidad innata del huésped. Rev Iberoam Micol. 2014; 31(1):76-80.
25. Zeidberg LD, Ajello L, Webster RH. Physical and chemical factors in relation to *Histoplasma capsulatum* in soil. Science. 1955; 122:33-34.
26. Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. Public Health Rep. 1949; 64: 892-896.
27. Di Salvo AF, Ajello L, Palmer JW, Winkler WG. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. Am J Epidemiol. 1969;89:606-614.
28. Fava SDC, Fava Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 40:155-164.
29. Panizo MM, Dolande M, Reviakina V, Maldonado B. Histoplasmosis pulmonar asociada con visitas a cuevas. Descripción de un brote epidémico y revisión de la literatura. Soc Ven Microbiol 2001;21(1):30-35.
30. Fernandez Andreu CM, Martinez Machín G, Illnait Zaragoza MT, Perurena Lancha MR, Gonzalez L. Brote de histoplasmosis ocupacional en la provincia La Habana. Rev Cubana Med Trop 2010; 62(1):68-72.

31. Marini M, Starck F, Parra SL, Remorino ML, Casas J, Finkelievich JL: Histoplasmosis genital. Un caso de difícil diagnóstico. Act Terap Dermatol 2006; 29(3):184-187.
32. Ajello L, Kuttin ES, Beemer AM, Kaplan W, Padhye A. Occurrence of *Histoplasma capsulatum* Darling, 1906 in Israel, with a review of the current status of histoplasmosis in the Middle East. Am J Trop Med Hyg 1977;26:140-147.
33. Hunt PJ, Harden TJ, Hibbins M, Pritchard RC, Muir DB, Gardner FJ. *Histoplasma capsulatum* isolation from an Australian cave environment and from a patient. Med J Aust 1984; 141:280-283.
34. Padhye AA, Pathak AA, Katkar VJ, Hazare VK, Kaufman L. Oral histoplasmosis in India: a case report and an overview of cases reported during 1968-92. J Med Vet Mycol 1994;32:93-103.
35. Teoh JW, Hassan F, Mohamad Yunus MR. Laryngeal histoplasmosis: an occupational hazard. Singapore Med J 2013; 54(10): e208-e210.
36. Imwidthaya P. Systemic fungal infections in Thailand. J Med Vet Mycol 1994;32(5)395-399.
37. Zhao B, Xia X, Yin J, Zhang X, Wu E, Shi Y, et al. Epidemiological investigation of *Histoplasma capsulatum* infection in China. Chin Med J (Engl). 2001 Jul;114(7):743-6.
38. Lazarus AS, Ajello. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo de una cueva en el Perú. Rev Med Exp 1955;9:5-15.
39. Negroni R, Duré R, Ortiz Nareto A, Arechavala AI, Maiolo EI, Santiso GM et al. Brote de Histoplasmosis en la Escuela de Cadetes de la Base Aérea de Morón, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2010; 42:254-260.
40. Wheat LJ. Histoplasmosis in Indianapolis. Clin Infect Dis 1992;14 (suppl 1): 91-99.

41. Jimenez RA, Uran ME, de Bedout C, Arango M, Tobon AM, Cano LE et al. Brote de histoplasmosis aguda en un grupo familiar: identificación de la fuente de infección. *Biomédica (Bogotá)* 2002; 22(2): 155-159.
42. Pérez J, Carrasco L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Rev Iberoam Micol* 2000;17(Supl):18-22.
43. Brömel C, Sykes JE. Histoplasmosis in dogs and cats. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2005;20(4):227-232.
44. Vargas Yañez R, Peña Sandoval GR., Chávez Tapia CB, Taylor ML. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998; 11:192-194.
45. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, et al. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis* . *Rev Argent Microb* (2005) 37: 46-56.
46. Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas DA, Cifuentes J, Taylor ML .The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31(1):11-15.
47. Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira RM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:4487-4494.
48. Beatriz Gomez. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges. *Rev Iberoam Micol* 2014: 31 (1): 35-41.
49. López C.E. Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. *Rev Argent Microbiol.* 2006;38: 235-242.
50. Johnson CH, Klotz MG, York JL, Kruff V, McEwen JE. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology* 2002: 148(4):1129-1142.

51. Nosanchuk JD, Gomez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancopé-Oliveira RM et al. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melani-like pigments in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun* 2002; 70: 5124-5131.
52. Negroni R, Arechavala AI, Maiolo EI. Histoplasmosis clásica en pacientes inmunocomprometidos. *Med Cutan Iber Lat Am* 2010; 38(2):59-69.
53. Goodwin RA Jr, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in normal host. *Medicine (Baltimore)*. 1981;60:231-266.
54. Rosenthal J, Brandt KD, Wheat LJ..et al Rheumatologic manifestations of histoplasmosis in the recent Indianapolis epidemic. *Arthritis Rheum.* 1983; 26:1065-1970.
55. Loyd JE, Tillman BF, Atkinson JB, Des Prez RM. Mediastinal fibrosis complicating histoplasmosis. *Medicine*, 1988;67: 295-310.
56. Wheat LJ, Wass J, Norton J, et al. Cavitory histoplasmosis occurring during two large urban outbreaks: Analysis of clinical, epidemiologic, roentgenographic, and laboratory features. *Medicine (Baltimore)*, 1984;63:201-209.
57. Limaye AP, Connolly PA, Sagar M, Fritsche TR, Cookson BT, Wheat LJ, et al. Transmisión of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. *N Engl J Med.* 2000;343:11163-11166.
58. Negroni R, Arechavala AI, Robles AM. Histoplasmosis diseminada crónica como afección oportunista. *Med. Cut. ILA.* 1987;15:377-383.
59. Deepe GS Jr. *Histoplasma capsulatum* (Histoplasmosis). En: Bennett J, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principle and Practice of Infectious Diseases*, 8<sup>th</sup> Edition. Elsevier Saunders; 2015; p. 2949-2963.
60. Silveira FP, Husain S. Fungal infections in solid organ transplantation. *Med. Mycol.* 2007;45:305-320.

61. Corti M, Cendoya CA, Soto I, Esquivel P, Trione N, Villafañe MF et al. Disseminated histoplasmosis and AIDS: clinical aspects and diagnostic methods for early detection. *AIDS Patient Care STDS*. 2000;14:149:154.
62. Negroni R. Manifestaciones cutáneas mucosas de la histoplasmosis diseminada (histoplasmosis clásica o histoplasmosis capsulati). *Dermatol. Argent*. 2008;14:104-110.
63. Muñoz CO, Cano LE, Gonzalez A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio*. 2010;14(2):145-158.
64. Negroni R. Micosis asociadas al SIDA: En: Benetucci J. SIDA y enfermedades asociadas. 3º Edición. FUNDAI. Buenos Aires. 2008; 325-351.
65. Arechavala AI, Robles AM, Negroni R, Bianchi M, Taborda A. Valor de los métodos directos e indirectos de diagnóstico en las micosis sistémicas asociadas al sida. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1993;35:163-169.
66. Bianchi M, Robles AM, Vitale R, Helou S, Arechavala AI; Negroni R. The usefulness of blood culture in diagnosing HIV- related systemic mycoses: evaluation of a manual lysis centrifugation method. *Med Mycol* 2000; 38: 77-80.
67. Kaufman L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin Infect Dis* 1992; 14(Suppl 1): 23-29.
68. Negroni R, Iovannitti C, Arechavala AI, Carnovale S, Euguchi K. Preparación y estudio de un exoantígeno de la fase levaduriforme de *Histoplasma capsulatum* para reacciones serológicas. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:282-285.
69. Restrepo A. Histoplasmosis. En: Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya BI, editors. *Enfermedades Infecciosas*. 6ª edición. Medellín: Fondo Editorial CIB; 2003; 316-326.
70. Guimaraes AJ, Pizzini CV; Matos-Guedes HL, Albuquerque PC, Peralta JM, Hamilton AJ, et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J Med Microbiol* 2004;54:509-514.

71. Lindsley MD, Holland HL; Bragg SL, Hurst SF, Wannemuehler KA, Morrison KJ. Production and evaluation of reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigenuria by enzyme immunoassay. Clin Vaccine Immunol 2007 Oct; 14(10):1387-1388.
72. Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER. Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the quantitation of *Histoplasma* antigen in human urine samples. Am J Clin Pathol. 2007;128:18-22.
73. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14:802-803.
74. Wheat LJ. Nonculture diagnostic methods for invasive fungal infections. Curr Infect Dis Rep. 2007; 9(6):465-471.
75. Egan L, Connolly P, Wheat J, Fuller D, Davis TE, Knox K et al. Histoplasmosis as a cause for a positive FungitellTM (1-3)- $\beta$ -D-glucan test. Med Mycol. 2007; 46(1): 93-95.
76. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detections of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human tissue. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1644-1647
77. Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nübling G. Rapid PCR-Based Diagnosis of disseminated Histoplasmosis in an AIDS patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002; 21:821-823
78. Muñoz C, Gomez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. Clin Vaccine Immunol. 2010;17:62-67.

79. Matos-Guedes HL, Guimaraes AJ; Muniz MM; Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. J Clin Microbiol. 2003; 41:535-539.
80. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. J Clin Microbiol. 2003; 41:1753-1755.
81. Spencer WH, Chao CC, Shen DF; Rao NA. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in lesions of chronic ocular histoplasmosis syndrome. Arch Ophthalmol 2003; 121: 1551-1555.
82. Ueda Y, Sano A, Tamura A, Inomata T, Kamei K, Yakoyama K et al. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. Vet Microbiol 2003; 94:219-224.
83. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25:16-22.
84. Simon S, Veron V, Boukhari R, Blanchet D, Aznar C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 66:268-273.
85. Sampaio Ide L, Lima Freire AK, Ogusko MM, Salem JI, De Souza JV. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Rev Iberoam Micol. 2012;29(1):34-39.
86. Fava SDC, Fava Netto C. epidemiolog survey of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity en Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 155-164.
87. Negroni R. Inmunología de las micosis. En: Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. La Habana: Ed. Científico-Técnica, 1982, 340-362.

88. Naiff RD, Barrett TV, Arias JR, Naiff MF. Encuesta epidemiológica de histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y leishmaniasis mediante pruebas cutáneas. Bol Of Sanit Panam 1988; 104:35-49.
89. Mota J, Pavillard A, Pérez R, Pérez-Ybarra L, Luis-Leon J. Prevalencia de la infección por *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* en agricultores del "Caserío La Entrada" Estado Aragua. Venezuela. Salud Trab. 2009;17(1):33-47.
90. Mangiaterra M, Alonso J, Galván M, Giusiano G, Gorodner J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1996; 38:349-353.
91. Marticorena BE, Borletto N, Negroni R. Rev Arg Micol 1991; 14:20-23.
92. Masih D, Marticorena B, Borletto N, Farías C, Negroni R. Epidemiologic study of bronchopulmonary micosis in the Province of Córdoba, Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1987; 29:59-62.
93. Negroni R, Robles AM, Arechavala AI. Histoplasmosis progresiva. Estudio en un lapso de 10 años. Rev Arg Micol 1994; 17:14-21.
94. Rodriguez de Marengo ZJ, Araujo AC, Negroni R, Dubra F, García OE. Encuesta epidemiológica de Histoplasmosis en la provincia de Salta. Rev Arg Micol 1979; 2:5-10.
95. van Gelderen de Komaid A, Duran EL, Madero AM, Carrizo V. Histoplasmosis in northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucumán. Eur J Epidemiol 1992; 8:206-210.
96. Weisburd GJ. Encuesta Nacional de Histoplasmosis. Rev Arg Micol 1995; 18:5-7.
97. Calanni LM, Pérez RA, Brasili S, Schmidt NG, Iovannitti CA, Zuiani MF, et al. Brote de histoplasmosis en la provincia de Neuquén, Patagonia Argentina. Rev Iberoam Micol 2013; 30 (3): 193-199.

98. Fienquelievich J, Tula L, Gonzalez F, Celia L, Cervoza R, Spina F. Estudio de un brote de histoplasmosis en Cortines Partido de Luján. IV Congreso Argentino SADI 2004. Mar del Plata Argentina; 7-9 de mayo de 2004.
99. Davel G, Canteros CE et al. Situación de las micosis en la República Argentina. Rev Argent Microbiol. 2007; 39:28-33.
100. Canteros CE, Rivas MC, Soria M, Lee W, Perrotta D, Rodero L. Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: Estudio multicéntrico en la República Argentina. Rev Argent Microbiol. 2004; 36:68-74.
101. Ajello L, George L, Kaplan W, Kaufman L. Laboratory manual for Medical Mycology. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Communicable Disease Center. Atlanta, Georgia, USA, 1962.
102. Negroni R, Guelfand L. Manual de Procedimientos para Laboratorios de Micología Médica. Acta Bioquim Clin Latinoam 1999; Supl 1: 55-57.
103. Zaror L, Robles AM, Negroni R. Pruebas de inmunodifusión en medios gelosados con el agregado de polientilenglicol 6000 para el serodiagnóstico de las micosis. Rev Argent Microbiol 1978; 10:61-64.
104. Negroni R, Iovannitti C, Arechavala A, Carnovale S, Eiguchi K. Preparación y estudio de un exo-antígeno de la fase levaduriforme de *H. capsulatum* para reacciones serológicas. Rev Iberoam Micol 1998; 15:282-285.
105. Alsip S, Dismukes WE. Approach to the patient with suspected histoplasmosis. En: Remington JS, Swart MN. (eds). Current clinical topics in infectious diseases. New York. Mc Graw Hill. 1986; p.254-296.

## ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



REGISTRADO BAJO N° CDBByF 885/14

BAHÍA BLANCA, 25.11.2014

VISTO:

Los protocolos evaluados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE); y

CONSIDERANDO:

Que los mismos fueron avalados por dicho Comité por el término de dos (2) años;

Lo aprobado por el Consejo Departamental de Biología, Bioquímica y Farmacia en su sesión ordinaria del día de la fecha;

POR ELLO:


El Consejo Departamental de Biología, Bioquímica y Farmacia;

### RESUELVE

1°).- **Aprobar** los protocolos evaluados y avalados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) que se detallan a continuación, por el término de dos (2) años a partir de la fecha:

- Protocolo 033/2014: "Fuentes de infección de histoplasmosis en la ciudad de Bahía Blanca. **Bqco. Marcelo Occhionero**. Cátedra de Bacteriología y Micología.
- Protocolo 036/2014: "El hierro como inductor de estrés oxidativo en el sistema nervioso central y en tejidos no neurales. Efecto terapéutico de aceites vegetales de distinto grado de insaturación y poder antioxidante". **Dra. Marta Roque**.
- Protocolo 037/2014 y 038/2014: "Selección de individuos, eficacia biológica y diferenciación de poblaciones en simpatria: procesos contemporáneos de invasión de medios urbanos en aves". **Dr. Sergio Zalba**.

2°).- Regístrese, comuníquese y pase para su conocimiento al CICUAE. Cumplido, archívese.

  
DR. M. T. CARMEN ESANDI  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
DEPTO. BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA  
U.N.S.

  
DR. RUBEN D. TANZI  
DIRECTOR DECANO  
DEPTO. DE BIOL. BIOQUÍMICA Y FARMACIA  
U.N.S.

## ANEXO 2



### COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA

Fecha de registro CCIS: 17/09/10. Nro de registro: 017/2010.

Folio: 54. Libro Actas: N° 1 Re-acreditado 27/09/2013.

Inscrito en el REINIS CE000063

Hospital Municipal de Agudos "Dr. L. Lucero"

Fax: 0291-4598484 -interno 2381 E-mail: [bioetica@hmabb.gov.ar](mailto:bioetica@hmabb.gov.ar)

Estomba 968 - (8000) BAHIA BLANCA [www.facebook.com/Bioetica.HMABB](http://www.facebook.com/Bioetica.HMABB)

Bahía Blanca, 9 de Enero de 2014

Investigador Principal

Bioq. Dina Pedersen

Su Despacho


**Ref: Proyecto de Tesis "Bahía Blanca, zona endémica para histoplasma capsulatum"**

Los integrantes del Comité Institucional de Bioética en sesión ordinaria han tomado conocimiento y analizaron el proyecto enviado con las correcciones solicitadas.

Siendo que los fundamentos del proyecto expresan en forma clara los objetivos del trabajo, manteniendo la confidencialidad de los datos obtenidos, con el voto unánime de los integrantes presentes se aprueba el documento analizado por cumplir con los principios Bioéticos sustentados por este Comité Institucional de Bioética.

Asimismo solicitamos que el Investigador Principal notifique al Comité Institucional de Bioética, todas las novedades referidas al Protocolo de Investigación

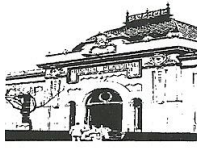
Atentamente,



Lic. ANALÍA CAMPES  
M.P. 887  
SUBCOORDINADORA  
COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA  
HOSPITAL MUNICIPAL DE AGUDOS "DR. L. LUCERO"

**Nota:** Los Códigos Nacionales e Internacionales en los que se basa el accionar de este Comité Institucional de Bioética son:

- Código de Nuremberg.
- Guías Éticas Internacionales para la Investigación médica en seres humanos



## COMITE INSTITUCIONAL DE BIOETICA

Fecha de registro CCIS: 17/09/10. Nro de registro: 017/2010.

Folio: 54. Libro Actas: N° 1 Re-acreditado 27/09/2013.


Inscrito en el RENIS CE000063

Hospital Municipal de Agudos "Dr. L. Lucero"

Fax: 0291-4598484 –interno 2381 E-mail: [bioetica@hmabb.gov.ar](mailto:bioetica@hmabb.gov.ar)

Estomba 968 - (8000) BAHIA BLANCA [www.facebook.com/Bioetica.HMABB](http://www.facebook.com/Bioetica.HMABB)

- Declaración de Helsinky y sus modificaciones.
- Precepto de Buenas Prácticas Clínicas en la investigación médica (GPC).
- Declaración de Lisboa-Derecho de los pacientes.
- Disposición 6677/10 del ANMAT.
- Disposiciones reglamentarias de la CCIS
- Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos (UNESCO 1997).
- Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos (UNESCO 2003).
- Ley N° 25.326 de Protección a los datos personales.
- Ley 11044 y su Decreto reglamentario 3.385 (Provincia de Buenos Aires).
- Dictamen 046/2011 de la CCIS sobre investigación con muestras biológicas.

  
Lic. ANALIZ CAMPO  
M.º 887  
SUBCOORDINADORA  
COMITE INSTITUCIONAL DE BIOETICA  
HOSPITAL MUNICIPAL de AGUDOS "Dr. L. LUCERO"

## ANEXO 3

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

#### HOSPITAL MUNICIPAL DE AGUDOS DR LEONIDAS LUCERO

#### Y SALAS MÉDICAS DE LA CIUDAD DE BAHIA BLANCA

#### “Bahía Blanca zona endémica para *Histoplasma capsulatum*?”

#### Reacción intradérmica con HISTOPLASMINA

**A) OBJETIVO DEL TRABAJO:** Determinar si la ciudad de Bahía Blanca, debe ser considerada como zona endémica para *Histoplasma capsulatum* y así contribuir al diagnóstico, prevención y control de la enfermedad.

Los pacientes que participarán de este estudio serán aquellos atendidos en los consultorios de Neumonología, Clínica Médica y Medicina Laboral del Hospital Municipal de Agudos Dr Leónidas Lucero; y en las Salas Médicas Periféricas, de la ciudad de Bahía Blanca.

No podrán participar aquellos pacientes menores de 18 años, ni mujeres embarazadas o que estén en el período de lactancia, ni aquellos pacientes que por razones físicas o psíquicas no se les pueda informar debidamente del objetivo de este trabajo, o no puedan dar su consentimiento por escrito de participar voluntariamente en el mismo.

El proyecto consiste en realizar una encuesta epidemiológica en la población de Bahía Blanca, utilizando una prueba intradérmica con la cual se inocularán 0.1 ml de histoplasmina diluida. Este antígeno fue obtenido por filtración del desarrollo de *H. capsulatum* mediante un método validado y estandarizado, en el Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Si Ud. acepta participar del estudio, se le aplicará con jeringa y aguja en la cara anterior del antebrazo derecho, vía intradérmica, 0.1 ml de histoplasmina diluida. Para su atención y toma de muestra se aplicarán normas de bioseguridad vigentes como el uso de guantes descartables e instrumental debidamente esterilizado y controlado.

Además se lo interrogará brevemente, para completar un cuestionario con datos personales y de interés epidemiológico que no le demandará más de 10 minutos. Deberá concurrir a las 48 horas al mismo lugar donde fue atendido para la lectura de la reacción.

**B) RIESGOS:** Las intradermorreacciones con histoplasmina se realizan desde 1945 en todo el mundo y han sido de gran valor epidemiológico en el estudio de las áreas endémicas. Esto no le implicará ningún perjuicio para su salud, solo se observará (en caso de ser positiva la reacción), una induración y enrojecimiento alrededor del área de inoculación. En algunos casos puede presentar prurito.

**C) CONFIDENCIALIDAD:** Su nombre no se publicará en ningún documento, informe o publicación resultante de este estudio.

Los archivos con sus datos se guardarán bajo estricta confidencialidad y se usaran códigos de identificación para preservar el anonimato del estudio.

**D) BENEFICIOS:** Se espera que los resultados de este estudio permitan un mejor conocimiento sobre la epidemiología de *H. capsulatum* en nuestro medio.

**E) CONSIDERACIONES FINANCIERAS:** Ud. no pagará por ninguno de los procedimientos del estudio, de la toma de muestra o pruebas de laboratorio asociados esta investigación. Tampoco recibirá pago o beneficio financiero. La profesional a cargo del estudio **no recibirá** ninguna retribución económica.

**G) CONSULTAS:** Si tiene Ud. preguntas no dude en realizarlas al profesional a cargo del estudio **Bioquímica Dina Pedersen**, personalmente, todos los días de 8 a 13hs en el Servicio de Bacteriología y Micología del Hospital Municipal de Agudos Dr. Leónidas Lucero, Estomba 968 de Bahía Blanca o por teléfono al 4598484 interno 2266 en el mismo horario.

La participación en esta investigación es absolutamente **Voluntaria**. Usted tiene derecho a declinar su participación y su retiro no influirá como paciente del Hospital Municipal o Salas Médica Periféricas.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Institucional de Bioética de Investigación del Hospital Municipal de Agudos Dr. L. Lucero. Es coordinador de dicho Comité el Dr Norman Pasquare, usted lo puede contactar telefónicamente al número 4598484 interno 2381, de lunes a viernes de 8 a 13 h.

**E)FIRMAS:** Yo he comprendido el objetivo del estudio, y los procedimientos. He tenido oportunidad de realizar preguntas que me han sido respondidas satisfactoriamente.

Entiendo que mi participación es totalmente voluntaria y puedo retirarme en cualquier momento.

Si Ud. ha comprendido esta explicación y está de acuerdo en participar en este estudio puede firmar a continuación

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Aclaración

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma de la investigadora

\_\_\_\_\_  
Aclaración

\_\_\_\_\_  
MN

\_\_\_\_\_  
Fecha

**ANEXO 4**

**CUESTIONARIO PARA PACIENTES**

**“Bahía Blanca zona endémica para *Histoplasma capsulatum*?”**

**Reacción intradérmica con HISTOPLASMINA**

**APELLIDO Y NOMBRES:**

**SEXO: M F**

**DIRECCIÓN:**

**TELEFONO:**

**EDAD:**

**FECHA INTRADERMORREACCIÓN:**

**LECTURA:**

**FECHA:**

**OCUPACIÓN:**

**TIEMPO DE PERMANENCIA EN LA CIUDAD:**

**LUGAR/ES DE RESIDENCIA ANTERIORES:**

**ENFERMEDAD DE BASE:**

## ANEXO 5

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

#### HOSPITAL MUNICIPAL DE AGUDOS DR LEONIDAS LUCERO

##### “Bahía Blanca zona endémica para *Histoplasma capsulatum*?”

**A) OBJETIVO DEL TRABAJO:** Determinar si la ciudad de Bahía Blanca, debe ser considerada como zona endémica para *Histoplasma capsulatum* y así contribuir al diagnóstico, prevención y control de la enfermedad.

Los pacientes que participarán de este estudio serán aquellos atendidos en forma ambulatoria o internados en el Hospital Municipal de Agudos Dr Leónidas Lucero o en el Hospital Interzonal Dr José Penna y que por sus manifestaciones clínicas el médico sospeche una infección por *Histoplasma capsulatum*.

No podrán participar aquellos pacientes menores de 18 años, ni aquellos que por razones físicas o psíquicas no se les pueda informar debidamente del objetivo de este trabajo, o aquellos que no puedan dar su consentimiento por escrito de participar voluntariamente en el mismo.

El objetivo de este estudio es el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* a partir de las diferentes muestras clínicas que el médico considere necesario tomar de los pacientes con sospecha de Histoplasmosis.

Si Ud. acepta participar del estudio, deberá permitir que todos los aislamientos de *Histoplasma capsulatum*, obtenidos a partir de los productos biológicos que el médico tratante haya considerado evaluar, sean utilizados por la investigadora de este trabajo. Se le practicará también una extracción de sangre para la investigación serológica.

**B) RIESGOS:** Esto no le implicará ningún perjuicio para su salud.

**C) CONFIDENCIALIDAD:** Su nombre no se publicará en ningún documento, informe o publicación resultante de este estudio.

Los archivos con sus datos se guardarán bajo estricta confidencialidad y se usaran códigos de identificación para preservar el anonimato del estudio.

**D) BENEFICIOS:** Arribar a un diagnóstico certero respecto de la patología en estudio y poder establecer un tratamiento adecuado.

**E) CONSIDERACIONES FINANCIERAS:** Ud. no pagará por ninguno de los procedimientos del estudio, de la toma de muestra o pruebas de laboratorio asociados esta investigación. Tampoco recibirá pago o beneficio financiero. La profesional a cargo del estudio **no recibirá** ninguna retribución económica.

**G) CONSULTAS:** Si tiene Ud. preguntas no dude en realizarlas al profesional a cargo del estudio: **Bioquímica Dina Pedersen**, personalmente, todos los días de 8 a 13hs en el Servicio de Bacteriología y Micología del Hospital Municipal de Agudos Dr Leónidas Lucero, Estomba 968 de Bahía Blanca o por teléfono al 4598484 interno 2266 en el mismo horario.

La participación en esta investigación es absolutamente **Voluntaria**. Usted tiene derecho a declinar su participación y su retiro no influirá como paciente del Hospital Municipal u Hospital Interzonal Dr José Penna.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Institucional de Bioética de Investigación del Hospital Municipal de Agudos Dr. L. Lucero. Es coordinador de dicho Comité el Dr Norman Pasquare, usted lo puede contactar telefónicamente al número 4598484 interno 2381, de lunes a viernes de 8 a 13 hs.

**E) FIRMAS:** Yo he comprendido el objetivo del estudio, y los procedimientos. He tenido oportunidad de realizar preguntas que me han sido respondidas satisfactoriamente.

Entiendo que mi participación es totalmente voluntaria y puedo retirarme en cualquier momento.

Si Ud. ha comprendido esta explicación y está de acuerdo en participar en este estudio puede firmar a continuación

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Aclaración

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma de la investigadora

\_\_\_\_\_  
Aclaración

\_\_\_\_\_  
MN

\_\_\_\_\_  
Fecha

**ANEXO 6**

**CUESTIONARIO PARA PACIENTES**

**“Bahía Blanca zona endémica para *Histoplasma capsulatum*?”**

Aislamiento de H capsulatum a partir de muestras clínicas

**APELLIDO Y NOMBRES:**

**SEXO: M F**

**HC:**

**DIRECCIÓN:**

**TELEFONO:**

**EDAD**

**TIEMPO DE PERMANENCIA EN LA CIUDAD**

**LUGAR/ES DE RESIDENCIA ANTERIORIOR/ES**

**HOSPITAL:**

**SERVICIO:**

**DIAGNÓSTICO:**

**ENFERMEDAD DE BASE:**

**MUESTRA/S PROCESADAS:**

**FECHA**

**RESULTADOS**

**SEROLOGÍA**

**TRATAMIENTO**

**EVOLUCIÓN:**

