



TÍTULO DEL PROYECTO

**Brote de histoplasmosis asociado a exposición laboral en
Neuquén, Patagonia Argentina**

TUTOR DEL PROYECTO

Dr. Ezequiel Klimovsky

AUTOR DEL PROYECTO

Dra. Liliana María Calanni

TITULO A OBTENER

Magister en Investigación Clínica Farmacológica

DIRECTORES DEL PROYECTO

Dra. Cristina Canteros

Dr. Jorge Finkelievich

Maestría de Investigación Clínica Farmacológica

Universidad Abierta Interamericana

Fecha: Diciembre 2011

Dr Jorge Luis Finquelievich

Director del Centro de Micología

Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina

Universidad de Buenos Aires

Dra. Cristina Canteros PhD

Jefa Servicio Micosis Profundas

Departamento Micología

INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán

INDICE

Resumen	3
Marco Teórico Conceptual	4
Justificación del problema	13
Objetivo del Trabajo, Hipótesis, Materiales y Métodos, Diseño y	
Población de Estudio	14
Mediciones realizadas	15
Resultados	22
Discusión	30
Conclusiones	33
Bibliografía	34
Agradecimientos	37

Resumen

Brotes por *H. capsulatum* fueron informados con frecuencia en el continente americano, sin embargo hasta la notificación de éste, no se había registrado otro asociado a exposición laboral en zonas australes por debajo del paralelo 34 de latitud sur.

Objetivo:

Describir las características epidemiológicas y clínicas de un brote de histoplasmosis asociado a exposición laboral en la ciudad de Zapala, Provincia de Neuquén, Patagonia Argentina.

Métodos:

Se evaluó el cuadro clínico y las características epidemiológicas de cinco pacientes involucrados. Se realizaron estudios ambientales para conocer la fuente de infección. Los aislamientos obtenidos de uno de los pacientes fueron analizados genéticamente utilizando una RADP-PCR con los primers 1281-1283. Los polimorfismos fueron comparados con 12 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* de pacientes argentinos y dos cepas de referencia: la cepa Downs y la G186B.

Resultados:

Los individuos trabajaban en el mantenimiento de caminos provinciales, todos eran residentes de Zapala y ninguno había salido de la provincia. Solo un paciente recibió antimicóticos (caso índice) y tuvo evolución favorable. Cuatro individuos tuvieron sintomatología leve y no requirieron medicación. Del caso índice pudo aislarse *H. capsulatum* de hemocultivos y biopsia de pulmón, siendo la serología para dicho microorganismo positiva. Tres de cuatro pacientes fueron diagnosticados solo por serología. La presencia del hongo pudo confirmarse a través de la detección de anticuerpos anti-*Histoplasma* en los ratones inoculados con la tierra obtenida de una alcantarilla en el Km 20 de la ruta 40, donde los operarios removieron tierra de un aluvión.

Conclusiones:

El primer brote epidémico de histoplasmosis en la provincia de Neuquén, Patagonia Argentina nos hace pensar que el hábitat del hongo se está extendiendo y el diagnóstico debe ser considerado en presencia de pacientes con cuadros respiratorios inespecíficos, como así también en aquellos con insuficiencia respiratoria y compromiso intersticial, aun en zonas no endémicas.

Marco Teórico – Conceptual

La histoplasmosis es una micosis endémica producida por el hongo termodimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *Capsulatum* (*Hc*). La micosis es cosmopolita, endémica en la zona central y medio oeste de los Estados Unidos (a lo largo de los valles de los ríos Misisipi y Ohio), México, América Central y del Sur (principalmente Honduras, Guatemala, Panamá, Jamaica, Puerto Rico, Martinica, Cuba, Venezuela, Colombia, Perú, Brasil, Argentina y Uruguay). Fuera del Continente Americano se ha demostrado la presencia del agente en partes del Africa (70 % provienen de Nigeria, Zaire, Uganda y Senegal, donde coexisten *Hc* var. *capsulatum* y var. *duboisii*), sudeste de Asia (en particular Tailandia, Malasia, Indonesia, India y Vietnam) y Australia (1).

Sin embargo, las áreas endémicas más importantes se sitúan en el continente americano en zonas con climas templados (temperaturas medias anuales de 22-29 °C), con precipitaciones anuales alrededor de 1000 mm y humedad relativa entre 67 y 87 % (2, 3). *Histoplasma capsulatum* tiene una fase saprofitica, en la naturaleza, como micelio tabicado ramificado hialino con macro y microconidias, y una parasitaria, en los tejidos del hospedero, en forma de pequeñas levaduras redondas con brotes (4).

La fase micelial infectiva del hongo crece en lugares oscuros y húmedos. Su presencia ha sido documentada en sótanos, construcciones viejas, galpones, cuevas, grutas, gallineros, asociado a excretas de aves y murciélagos que le proveen un excelente medio para su desarrollo. También se han señalado como fuentes de infección suelos fertilizados con materia fecal de aves y/o murciélagos o espacios verdes con abundantes deyecciones de aves (5). Estos requerimientos especiales de crecimiento explican, en parte, la localización de la histoplasmosis en los llamados microfocos. Actividades que se realizan en esas áreas pueden producir disturbios de las mismas que se asocian a exposición al *H. capsulatum*. Corrientes de aire pueden transportar conidias a gran distancia, exponiendo a individuos, los que no tendrán conocimiento de haber estado en áreas contaminadas. Más aún, sitios del medio ambiente que no están visiblemente contaminados con excretas pueden albergar al microorganismo, haciendo muy difícil sospechar a la histoplasmosis en un número significativo de casos.

A diferencia del murciélago, la infección nunca fue documentada en aves, probablemente debido a su alta temperatura corporal (6).

La disrupción del suelo que contiene excrementos de aves o murciélagos es una forma frecuente de generar aerosoles y exponer al ser humano a los esporos.

Una importante cantidad de comunicaciones han documentado brotes adquiridos por exposición laboral asociados con tareas de construcción y actividades de remodelación de áreas. Sin embargo, personas no directamente involucradas con el proceso de disrupción de los suelos, incluyendo viajeros que pasan por áreas endémicas, también tienen riesgo incrementado pues los esporos que se encuentran en el aire pueden ser transportados a una distancia

considerable del sitio donde se generaron. La infección en humanos se produce por la inhalación de conidios y fragmentos de hifas que el hongo produce en la naturaleza (3). Por ello, las personas que trabajan en la construcción, excavación y remodelación de construcciones, o aquellas que tienen algunos hobbies o realizan actividades tales como espeleología o viajeros a áreas endémicas pueden ponerse en contacto estrecho con aerosoles contaminados y por ende con alto riesgo de desarrollar la infección con el hongo.

Las **manifestaciones clínicas** de la primoinfección de histoplasmosis varían desde formas asintomáticas o leves, que son las más frecuentes y ocurren en el 95 % de casos aproximadamente, a formas diseminadas y graves. El período de incubación es de aproximadamente 15 días (rango 5 a 18). En la mayoría de los pacientes la infección se auto limita y puede dejar calcificaciones residuales en los pulmones, los ganglios linfáticos y el bazo en aproximadamente el 30 % de los casos. Un pequeño porcentaje de pacientes puede padecer enfermedad pulmonar progresiva crónica, enfermedad cutánea o sistémica, o infección sistémica aguda fulminante, rápidamente fatal. Este último cuadro es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos y en niños. La severidad de la enfermedad depende de factores tales como la concentración de elementos infectantes en el inóculo, estado inmunitario y edad del huésped (7).

Existen diferentes **clasificaciones clínicas** (8). Siguiendo a Negroni (9) se puede 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 microepidemias.

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 respuesta inmune:

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

1.5 Forma pulmonar crónica progresiva:

- a) Infiltrados difusos e intersticiales biapicales.
- b) Lesiones cavitarias en los vértices pulmonares.

2. Histoplasmosis en el huésped inmunocomprometido:

2.1 Histoplasmosis diseminada crónica

2.2 Histoplasmosis diseminada subaguda.

2.3 Histoplasmosis diseminada aguda.

El hombre adquiere la infección por inhalación de conidios de la naturaleza, la mayoría de las infecciones subclínicas o leves, pueden presentar estas personas prueba cutánea con histoplasmina positiva o pequeñas lesiones calcificadas que contienen hongos en los pulmones o en ganglios del mediastino.

La mayoría de los conidios inhalados llegan intactos a los alveolos pulmonares, estimulando una respuesta inflamatoria del huésped que involucra a células mononucleares y macrófagos que son ineptos para destruir al microorganismo. El *Histoplasma capsulatum* se multiplica en el interior de los macrófagos y por vía linfática a partir de los pulmones acceden a los ganglios parahiliares y mediastinales y luego a la circulación sistémica, produciendo focos inflamatorios en otros órganos como bazo y médula ósea. Luego de la segunda o tercera semana del inicio de la infección, aparece una respuesta de tipo Th1, que produce interferón – gamma y otras citoquinas, que activan a los macrófagos, los que adquieren la capacidad de lisar a las levaduras intracelulares del *Hc*. Esta respuesta promueve la formación de granulomas epitelioides, con células gigantes de tipo Langhans y necrosis tipo caseosa que se resuelven por fibrosis y calcificación en un tercio de los casos. La respuesta Th2 se monta y se forman anticuerpos específicos detectables en el suero de los pacientes. La respuesta Th1 lleva al control de la infección aportando resistencia. Hongos viables pueden permanecer en áreas cicatrizadas por varios años.

Excepcionalmente la infección puede producirse por vía cutánea, origina un síndrome chancriforme similar al de la esporotricosis e involuciona espontáneamente en un mes (9).

En los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, por lo habitual varones, grandes fumadores y de raza blanca, la infección pulmonar primaria no cura espontáneamente, genera focos de neumonitis crónica intersticial, que conduce a un cuadro clínico similar a la tuberculosis crónica excavada (9).

La histoplasmosis diseminada aguda es más frecuente en la primera infancia y se la observa también cuando se comporta como una micosis oportunista. La fiebre elevada, adenopatías múltiples, trastornos gastrointestinales, acentuada pérdida de peso, lesiones cutáneo-mucosas, anemia y leucopenia, son las manifestaciones de esta forma clínica. Las lesiones cutaneomucosas suelen ser múltiples y polimorfas: pápulas semejantes a leucemides, púrpuras o petequias, lesiones acneiformes que evolucionan hacia la ulceración. El sistema nervioso central y los huesos pueden, también, participar en este cuadro sintomático. (10).

En el año 1984, Pablo Negroni y Ricardo Negroni mencionaban que la forma diseminada crónica era la más frecuentemente observada en la Argentina, con una mayor incidencia en el sexo masculino entre los 40 y 60 años. (10). Con el crecimiento de la pandemia

de SIDA a partir de la década del 80, el número de pacientes con esta patología y formas diseminadas de presentación fue incrementándose en nuestro país, en forma similar a lo ocurrido en otras partes del mundo.

Las formas progresivas, extrapulmonares de la histoplasmosis se deben a fallas de la inmunidad de tipo Th1. En los casos más graves la pruebas cutáneas con histoplasmina son negativas, el número de órganos afectados es mayor, el curso de la enfermedad es más agudo y la carga fúngica en los tejidos es muy elevada (9)

La inmunodepresión parece ser un factor preponderante en desencadenar la reactivación de una infección previa. El *Histoplasma capsulatum* puede ser considerado uno de los patógenos oportunistas más importantes del ser humano. Pacientes con linfoma, trasplante renal, cardíaco o hepático, personas que reciben altas dosis de corticoides, y pacientes con SIDA pueden presentar cuadros graves de histoplasmosis diseminada, como consecuencia de la reactivación de infecciones latentes, o menos frecuentemente de la re exposición al microorganismo en áreas hiperendémicas. Es decir, que la respuesta clínica de los pacientes que se infectan depende de una serie de factores, entre los que se destacan la respuesta inmunológica y el tamaño del inóculo. Formas diseminadas de micosis, muestran una respuesta inmunológica de tipo Th2, que producen citoquinas del tipo IL4, IL5 e IL10 que son inhibitoras de la respuesta protectora Th1. En estos casos, los granulomas se forman mal o no se forman, con gran proliferación de macrófagos, prueba cutánea a histoplasmina negativa, títulos de anticuerpos muy elevados y curso de la infección aguda y grave. (11).

Una persona que ha tenido histoplasmosis puede presentar reinfección luego de reexposición al *Hc*. No se debe confundir reactivación de infección latente (inactiva) con reinfección.

La reactivación, como se mencionó, puede ocurrir en personas añosas y en pacientes inmunocomprometidos, luego de años de sufrir infección primaria por *H. capsulatum*. La actividad

metabólica de las levaduras inactivas (el concepto de levadura inactiva no es claro) y los mecanismos por los cuales estos microorganismos escapan a la eliminación por parte del sistema inmunitario del huésped son desconocidos (12).

Múltiples estudios de laboratorio pueden ser utilizados para el **diagnóstico**, incluyendo cultivos, histopatología, búsqueda de antígenos o biomarcadores, serología y métodos moleculares. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas dependen de factores que incluyen el síndrome clínico del paciente, tipo y momento de la recolección de la muestra, carga fúngica, y estado inmunitario del huésped (1).

El diagnóstico de la histoplasmosis se puede realizar por examen directo de muestras representativas, de acuerdo a la localización de las lesiones, a través de la realización de la coloración de Giemsa de extendidos que permiten observar las levaduras con una masa

cromática única polar dentro y fuera de las células, que constituye un diagnóstico de alta sospecha. Los cultivos a dos temperaturas con la recuperación de ambas fases, la saprofítica a temperatura ambiente donde observamos micelios hialinos tabicados y ramificados con macroconidios esféricas y espiculadas acompañadas de microconidias y a 37° C las formas levaduriformes, constituye el diagnóstico de certeza.

La detección de anticuerpos hace pensar que el hongo está produciendo enfermedad pues el hallazgo de anticuerpos coincide con el periodo de enfermedad y convalecencia posterior. La caída del título de los mismos es un signo de buen pronóstico y permite el seguimiento de los pacientes.

La prueba cutánea utilizando histoplasmina como antígeno, es una herramienta importante para conocer antecedentes de exposición, en especial en áreas no endémicas, sin embargo, esta prueba no posee valor diagnóstico (13).

La presencia del hongo se puede demostrar por el crecimiento de la fase micelial a temperatura ambiental 28 °C, donde desarrollarán colonias algodonosas en medios de cultivo como agar-glucosado de Sabouraud y en Lactrimel de Borelli. El examen microscópico de estas colonias permite observar la presencia de macro y microconidias típicas. Las macroconidias miden entre 8 a 15 micrómetros, en tanto las microconidias o pequeños esporos miden entre 2 y 5 micrómetros de diámetro. Incubando la muestra a 37° C, en agar caldo infusión cerebro-corazón con o sin sangre bovina, el hongo desarrolla la fase levaduriforme, como en los tejidos. Las levaduras son ovals a redondeadas, y su diámetro es de 1 a 5 micrómetros. Si bien los cultivos permiten el desarrollo de la fase micelial y levaduriforme entre los 10-15 días, es necesario mantener los cultivos hasta 30 días para descartarlos como negativos. La identificación de la fase micelial se basa en las características micromorfológicas de los cultivos, pero debe confirmarse a través de la prueba de exoantígenos con antisero específico y en algunos países se cuenta con sondas de ADN aptas para la identificación de este microorganismo. Por el riesgo para el personal del laboratorio que maneja estos cultivos se recomienda que los mismos sean manipulados en cámaras de bioseguridad BS3 (9).

Las muestras que brindan mayor utilidad para el diagnóstico dependen de la forma clínica, la localización de las lesiones y la metodología a emplear (9).

Escarificaciones y biopsias cutáneo-mucosas: en la Unidad de Micología del Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco Javier Muñoz de Buenos Aires, en más del 60 % de los pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, el diagnóstico se obtuvo por escarificación o biopsia de lesiones cutáneas. La toma de muestra se debe realizar luego de la asepsia de la piel, se levantara la costra que cubre la lesión y se tomara el material del fondo de la misma con una hoja de bisturí, y se preparan extendidos que se observan al microscopio previa tinción con Giemsa. Las biopsias remitidas que deben ser enviadas en solución salina estéril, permiten además realizar cultivos para el aislamiento de los hongos. (9).

Secreciones respiratorias: el esputo y el lavado broncoalveolar son materiales útiles para el aislamiento del hongo cuando hay compromiso respiratorio. Sin embargo, la visualización de las levaduras en la coloración de Giemsa no tiene tan alto rendimiento en estas muestras y requieren mayor experiencia del observador. En muchos casos la presencia de *Candida* puede dificultar la tarea. Expertos sugieren obtener muestras seriadas de esputo para aumentar el rendimiento de este material, e incubar tubos a 28^o C para obtener la fase filamentosa del hongo y evitar el desarrollo de bacterias contaminantes y a 37^a C en medios enriquecidos para el crecimiento de la fase de levadura y acortar el tiempo de incubación. En muestras muy contaminadas también pueden agregarse tubos con medios adicionados de cicloheximida (9).

Hemocultivos: Los pacientes que presentan hemocultivos positivos suelen tener peor evolución (9). Según la experiencia reportada por integrantes de la Unidad de Micología del Hospital Muñiz de Bs As a partir del resultado de 5034 hemocultivos implementando el método de lisis- centrifugación con saponina, en 322 muestras de sangre (6.3%) obtenidas a partir de pacientes HIV positivos desarrolló un hongo. *H. capsulatum* se aisló en 95 (1.89%). Este método fue el más importante para confirmar el diagnóstico en el 54% de pacientes con histoplasmosis. (14). En esa institución se desarrolló el método de lisis-centrifugación que tiene el mismo rendimiento que el comercial (Isolator) (9).

Mielocultivo: la punción-aspiración de médula ósea, en los extendidos teñidos con Giemsa, puede mostrar las levaduras características y permite el aislamiento de *H. capsulatum* con igual sensibilidad que los hemocultivos.

Otros materiales: recolección de LCR, biopsia de ganglios, nódulos subcutáneos, mucosa gástrica, entre otros.

La anatomía patológica colabora con el diagnóstico, ya que en diversas muestras (piel, mucosas, pulmones, médula ósea, hígado, ganglios linfáticos, intestino) se demuestra la presencia de granulomas epitelioides, de aspecto sarcoide, donde los microorganismos pueden ser observados en el interior de las células utilizando tinciones especiales tales como Gomori o Grocott y PAS. Es frecuente que estos pacientes con poco compromiso de la inmunidad presenten necrosis caseosa en el centro del granuloma.

En los granulomas bien organizados el número de levaduras es más reducido, y casi siempre se los encuentra en el interior de macrófagos o células gigantes, en áreas de necrosis o en pacientes con escasa capacidad de respuesta Th1, pueden estar libres. En la primera de estas situaciones habitualmente están muertas y solo pueden ser vistas en la coloración de metenammina de plata de Grocott.

En los pacientes gravemente inmunocomprometidos predomina los fenómenos necróticos y una respuesta inflamatoria constituida por infiltrados difusos de macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos, no se observan granulomas epitelioides compactos, ni necrosis

caseosa, y se ven gran cantidad de elementos levaduriformes, tanto dentro como fuera de los macrófagos. (9).

Existen diversas pruebas serológicas con diferentes sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de histoplasmosis. La inmunodifusión y la fijación de complemento, utilizando histoplasmina como antígeno, muestran positividad cercanas al 80 %, incluyendo aquellos con infección aguda autolimitada. Reacciones falso negativas pueden ocurrir en pacientes inmunodeprimidos con enfermedad diseminada. Títulos de anticuerpos 1/32 o mayores, por técnica de fijación de complemento, sugieren infección activa. La prueba de inmunodifusión es más específica pero menos sensible que la fijación de complemento.

El test de inmunodifusión cualitativa, mide anticuerpos precipitantes que permiten detectar 2 bandas características la H y la M. Dado que la banda H del test de inmunodifusión está presente por solo 4 a 6 semanas posteriores a la exposición, en general su presencia indica infección activa. La banda M se observa más frecuentemente, aparece precozmente luego de la infección aguda y puede persistir hasta 3 años luego de que el paciente se recupera.

El test de fijación de complemento, mide anticuerpos contra la forma levaduriforme intacta y antígeno micelial (histoplasmina), y como se comentó, es más sensible pero menos específica. Los anticuerpos fijadores de complemento pueden aparecer 3 a 6 semanas luego de la infección (a veces tan precozmente como 2 semanas) y puede persistir positiva por meses. Títulos altos (1:32 o mayores) o el incremento de cuatro veces entre la primera y segunda muestra de suero permiten establecer el diagnóstico de infección activa. Títulos bajos (1:8 o 1:16) aunque menos específico puede hacer presumir evidencia de infección, pero también se encuentran en personas de áreas endémicas. Estos anticuerpos desaparecen meses a años después de que el paciente se recupera (12).

También se utilizan técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), y la experiencia clínica acumulada muestra que es más sensible y específica que la fijación de complemento (11).

Dado que en la histoplasmosis aguda es raro que se obtengan muestras de tejido para examen micológico, el diagnóstico en estos casos se basa en las pruebas serológicas. Por ello, es importante obtener dos muestras de suero (fase aguda y convalecencia) para establecer el diagnóstico. Debido a la dificultad en muchos casos de obtener la segunda muestra, se torna dificultosa la confirmación de casos en pacientes con estadios tempranos de infección aguda. Los estudios realizados muestran la importancia de obtener una segunda muestra (46 % de positividad con una sola, vs. 76 % con muestra de fase aguda y convalecencia) (13).

En pacientes con SIDA las pruebas serológicas solo dan resultados positivos en menos del 50 % de los casos, excepto el ELISA donde la proporción de resultados positivos es mayor. En pacientes trasplantados también su utilidad es limitada ya que los títulos suelen ser bajos. (9).

Se han utilizado otros métodos de detección de anticuerpos como el Western blot, que han demostrado una sensibilidad del 90 % en las formas pulmonares agudas, con 100 % de especificidad, cuando se utiliza un antígeno deglicosilado.

La detección del antígeno en suero, y especialmente en orina es más útil para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA. En EEUU se utiliza rutinariamente una prueba de ELISA, y aún no se ha logrado la especificidad deseada por reacciones cruzadas con paracoccidiodomicosis y blastomicosis. La sensibilidad mejora cuando las muestras se tratan con EDTA y calor, para romper los complejos inmunes. El antígeno polisacárido del hongo ha sido detectado en sangre en el 85 % de muestras y en el 95 % de orina de pacientes infectados, y este test puede también ser aplicado a otros líquidos o a secreciones respiratorias. El uso de anticuerpos monoclonales que reconoce epitopes especie-específicos en un ELISA de inhibición ha demostrado una sensibilidad de 71% y especificidad de 98% y permite detectar antígeno en LCR y lavado broncoalveolar (15).

En general, el testeo del suero en fase aguda y convaleciente ofrece la mayor sensibilidad para enfermedad pulmonar subaguda y crónica, y el test de antigénico (ej. ELISA de segunda generación, cuantitativo) parece ser uno de los más sensibles para histoplasmosis pulmonar aguda (1).

Hay avances en la implementación de técnicas de PCR para el diagnóstico del hongo.

Las técnicas para detectar B1-3 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 (9).

Las pruebas cutáneas no están recomendadas para el diagnóstico, ya que un resultado positivo no permite diferenciar infección pasada de actual. De igual modo, un test negativo no descarta enfermedad. Este test es ideal para estudios epidemiológicos en áreas endémicas de micosis.

El **tratamiento** depende de la forma clínica de presentación y del tipo de huésped. Los antifúngicos utilizados son anfotericina liposomal, anfotericina desoxicolato, e itraconazol, dependiendo del cuadro clínico, y tipo de huésped. Los otros azólicos son considerados de segunda línea, y no hay pruebas fehacientes de que su eficacia sea comparable a la del itraconazol (fluconazol, ketoconazol, voriconazol y posaconazol).

En relación a las indicaciones de tratamiento, pueden resultar de utilidad las guías elaboradas en el 2007 por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) (17), si bien utilizan otro tipo de clasificación clínica, y consideran:

Indicaciones de eficacia probada o probable:

- Infección pulmonar diseminada aguda con síntomas moderados a severos y severos
- Infección pulmonar cavitada crónica

- Infección diseminada progresiva
- Infección del sistema nervioso central

Indicación de tratamiento es desconocida o incierta:

- Infección pulmonar focal aguda, casos asintomáticos o síntomas leves que persisten por más de un mes
- Linfadenitis mediastinal
- Granuloma mediastinal
- Síndromes inflamatorios, tratados con corticoides.

Tratamiento no recomendado, eficacia desconocida o ineficaz:

- Fibrosis mediastinal
- Nódulo pulmonar
- Broncolitiasis
- Presunción de Síndrome de histoplasmosis ocular

Los **brotes epidémicos** de histoplasmosis ocurren cuando hay exposición a aerosoles con elevada concentración de conidios. Como ya se ha mencionado, estos brotes fueron descritos en general cuando las personas se exponen a una fuente común, en actividades laborales o recreativas, tales como limpieza de parques, demolición de edificios, visitas a cavernas o cuevas, entre otras. Estas epidemias se relatan principalmente en Sureste de Estados Unidos, México, Venezuela, Brasil, países de Centroamérica, y en viajeros que visitan estas áreas geográficas (2, 5).

Hay una serie de **actividades ocupacionales y recreativas con riesgo de exposición** a esporos de *H. capsulatum*. Estas personas deben tomar medidas adecuadas para prevenir la exposición siempre que se manipule suelo contaminado, guano de murciélago o estiércol de aves: limpiador de chimeneas, trabajador de la construcción y de demolición, granjero y trabajador agrícola, jardinero, instalador o agente de servicios de sistemas de aire acondicionado y calefacción, trabajador de laboratorios de microbiología, restaurador de edificios históricos o abandonados, espeleólogos o personas que realizan actividades en cavernas, entre otros.

En nuestro país, el **área endémica** conocida de esta micosis abarca 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 (18, 19, 20, 21, 22, 23, 13, 24). También se han descripto casos autóctonos en la provincia de Mendoza. En la Argentina, entre el 30% y el 40 % de los habitantes adultos aparentemente sanos de las áreas endémicas han sufrido la infección por este hongo.

No se han notificado casos autóctonos en provincias patagónicas y hasta el 2002, los brotes epidémicos mas australes relatados en la literatura revisada corresponden al estado de Rio Grande do Sur, Brasil por encima del paralelo 32º de latitud sur (25).

En la mayoría de los brotes reportados, asociados a exposición laboral, los autores remarcan la necesidad de educar al personal acerca de los riesgos de contraer este tipo de infecciones, como así también sobre la necesidad de utilizar elementos de protección individual para minimizar los mismos (26, 27, 28).

El **objetivo de este trabajo** es describir las características epidemiológicas y clínicas de un brote de histoplasmosis asociado a exposición laboral en la ciudad de Zapala, Provincia de Neuquén, Patagonia Argentina.

Justificación del Problema

En la provincia de Neuquén hasta el estudio de este brote en el año 2002 no se había diagnosticado histoplasmosis como micosis autóctona.

Hasta esa fecha, los casos de histoplasmosis diagnosticados en esta provincia, son en la gran mayoría en huéspedes inmunocomprometidos, se asumieron como reactivaciones o menos frecuentemente como infecciones agudas adquiridas por el paciente en zonas endémicas.

En los pacientes descriptos en este brote, el diagnóstico presuntivo por el cual fueron derivados del Hospital Interzonal de Zapala (HIZ) al Hospital Provincial Neuquén Dr. Castro Rendón (HPN), el de mayor complejidad de la provincia, fue síndrome pulmonar por Hantavirus (SPH). Esto se fundamentaba en la magnitud de las lesiones pulmonares, como así también en el hallazgo de excretas de roedores en el sitio donde los operarios pasaban algunas horas diarias para alimentación y descanso (casilla en el campamento de vialidad). Sin embargo, al evaluar a los pacientes a su arribo al HPN ese diagnóstico parecía muy poco probable por razones tales como: a) la tasa de ataque del hantavirus no suele ser tan alta como la que se observaba en estos operarios expuestos, b) cuando el hantavirus produce manifestaciones respiratorias y patología pulmonar, suele acompañarse de ciertas alteraciones de laboratorio y clínicas (hematocrito elevado, plaquetopenia, leucocitosis con marcada desviación a la izquierda de la fórmula, alteraciones del sedimento de orina, alteraciones de la función renal, shock no cardiogénico en los pacientes más severamente afectados) (29), c) Zapala no es un área en la que se hubieran diagnosticado casos previamente.

Al interrogatorio, surgieron datos epidemiológicos que permitieron sospechar acerca de la exposición a una fuente común y probable adquisición por vía inhalatoria de algún microorganismo, en especial un hongo. La histoplasmosis se sospechó como una de las más probables etiologías desde el inicio, sin embargo, no solo no estaba descripta como endémica en Zapala, sino en ningún sitio de la provincia de Neuquén.

El aislamiento de un microorganismo responsable a partir de muestras de los pacientes y ambientales permitiría establecer el diagnóstico etiológico, profundizar los conocimientos de nuevos agentes endémicos, con las consiguientes modificaciones en conductas diagnósticas y

terapéuticas frente a casos similares, como así también la implementación de medidas preventivas en relación a exposición.

Objetivo del Trabajo:

Primario:

Describir el estudio de brote de histoplasmosis ocurrido en el 2002 en Neuquén, que constituyó:

- Primer brote de histoplasmosis asociado a exposición laboral en la Argentina.
- Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* autóctono en Neuquén.
- Desarrollo de una cepa diferente a otras halladas en Argentina.

Secundario:

- Detallar las dificultades que se plantean en situaciones similares y las soluciones que se encontraron

Hipótesis

Los cuatro pacientes derivados al HPN desde el HIZ con neumonía intersticial aguda y diagnóstico presuntivo de SPH presentaban una infección pulmonar de probable etiología micótica por la forma de presentación, la tasa de ataque y la epidemiología.

Materiales y Métodos

Estudios Clínicos

Diseño

Estudio descriptivo, retrospectivo, basado en el análisis de las historias clínicas (HC) de cuatro pacientes que se presentaron con síntomas de difícil diagnóstico en el año 2002 en Neuquén y el análisis de las muestras ambientales obtenidas para el estudio de este brote.

Población de Estudio

Cuatro pacientes que ingresaron al HPN, derivados del HIZ con neumonía intersticial aguda y diagnóstico presuntivo de SPH. Un quinto paciente fue citado y evaluado en forma ambulatoria semanas después, a raíz del diagnóstico efectuado en sus compañeros de tareas laborales. Una sexta persona, que compartió las mismas actividades que las anteriores, se negó a ser examinada.

En función de los resultados obtenidos, se implementaron estudios ambientales en 7 sitios de la provincia de Neuquén, cercanos a la ciudad de Zapala, donde los operarios habían realizado los últimos trabajos

Mediciones realizadas

Estudios Clínicos: los pacientes fueron sometidos a un interrogatorio con el fin de identificar el cuadro clínico y arribar a un diagnóstico correcto. Se les interrogó sobre antecedentes de relevancia (personal, familiar y ambiental), lugares visitados, trabajos realizados, hábitos de esparcimiento y contactos con animales.

A todos los pacientes se les realizó evaluación clínica, imágenes (Rx y TAC de tórax y ecografía en el caso índice), laboratorio general, estudios microbiológicos (urocultivo y hemocultivos para gérmenes comunes y hongos), estudios serológicos considerando diversas etiologías de neumonías atípicas, incluyendo las endémicas en otras áreas (*Hantavirus*, *Leptospira*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *M. pneumoniae* y *Chlamidofora psittaci* y *C.pneumonie*). Además se solicitó serología para HIV, y reacciones cutáneas (PPD, coccidioidina e histoplasmina). En el caso índice se decidió realizar biopsia de pulmón para estudios histopatológicos y microbiológicos dada la mala evolución del paciente en ausencia de diagnóstico etiológico.

Los pacientes iniciaron tratamiento empírico con doxiciclina 200 mg/día

Estudios ambientales. Las muestras se recolectaron en septiembre y en diciembre de 2002. Los equipos de trabajo eran interdisciplinarios, constituidos por médicos (infectólogos, clínicos, generalistas, epidemiólogos, micólogos), bioquímicos especializados en microbiología y micología, veterinarios y espeleólogos. Se contó con la colaboración de profesionales de Zapala, Neuquén, Buenos Aires y con apoyo incondicional del Departamento de Micología de INEI- ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán” y del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la UBA, como así también de Epidemiología de Nación y de la Provincia de Neuquén.

En septiembre de 2002, se realizó la búsqueda de la fuente de infección en los lugares donde los trabajadores desarrollaron actividades. La investigación consistió en primer lugar en una inspección visual, que incluyó el sitio donde los operarios descansaban entre tareas en la ciudad de Zapala (campamento de vialidad y casilla de descanso). Luego se obtuvieron muestras de tierra a diferentes profundidades de lugares donde los operarios realizaron el trabajo, en algunos casos el suelo estaba asociado a material fecal de aves y otros animales. La colecta se realizó en: (a) un terreno cercano a un basural al norte de Zapala, b) una alcantarilla aluvional en el Km 20 de la ruta 40 entre Zapala y Las Lajas, donde los trabajadores refirieron haber removido tierra; (c) una zona aledaña al Cerro Cansino donde los obreros habían removido piedras, y (d) alrededores de la laguna El Toro, 6 Km al SO de Zapala. **Figura 1, 2, 3, 4 y 5**

Figura 1.- Entrada de alcantarilla



Figura 2.- Interior de alcantarilla



Figura 3.- Parte del equipo interdisciplinario en terreno



Figura 4.- Paraje de ruta 40 cercano a la alcantarilla



Figura 5.- Laguna El Toro



En diciembre de 2002, después de haber llegado al diagnóstico de certeza de histoplasmosis, se realizó una segunda búsqueda de *H. capsulatum* en el ambiente en zonas cercanas a Zapala con el fin de conocer el hábitat del hongo en la región. En esa oportunidad se recogieron muestras de suelo de cavernas y áreas sospechosas: (e) zonas aledañas al espejo de agua del Parque Nacional Laguna Blanca, (f) cavernas de Chenque Haychol y (g) caverna del Gendarme perteneciente al sistema cavernario de Cuchillo Curá. Además, en las cavernas se expusieron ratones Bal-c como centinelas de infección (30), por el lapso de 8 hs, 6 en Chenque Haychol y 9 en Gendarme. **Figuras 6, 7, 8 y 9.**

Figura 6.- Caverna Gendarme



Figura 7.- Dres. Canteros y Finguelievich con ratones centinela



Figura 8.- Ingreso a una de las cavernas



Figura 9.- Laguna Blanca



Los sitios de la colecta de ambos estudios ambientales están señalados en la Figura 10 y la distribución de las muestras de acuerdo al lugar en la **Tabla 1**.

Se procesaron en total 38 muestras de suelo (22 tomadas en septiembre y 16 en diciembre).

peptona 1 %, agar 1,5 %, cicloheximida 0,004 % y cloranfenicol 0,0025 %) y ASG-CC suplementado con rosa de Bengala 0002 %. Las botellas se incubaron a 25 °C en cámara húmeda y fueron revisadas diariamente hasta los 40 días o hasta la aparición de colonias sospechosas. Las colonias sospechosas fueron reaisladas, y estudiadas en base a sus características macro y microscópicas (31).

Paralelamente se inocularon 0,5 ml del sobrenadante a ratones Bal-c vía intraperitoneal (5 ratones por cada muestra de tierra procesada total 190 ratones).

Los ratones centinelas y los inoculados con tierra fueron mantenidos en condiciones de bioseguridad, debidamente acondicionados, suministrándole alimentos y agua *ad libitum* durante 50 días. Los animales fueron sacrificados según recomendaciones de la “Reglamentación para bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o de análisis para terceros de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica” (32).

Se realizó necropsia completa y se evaluó y registró las características macroscópicas de los principales órganos (hígado, bazo, riñones y pulmones). El macerado de cada uno de los órganos de cada ratón fue inoculado en ASG-CC en tubos e incubados por 50 días a 25 °C o hasta desarrollo de alguna colonia sospechosa. Las colonias sospechosas fueron reaisladas, y estudiadas con base en sus características macro y microscópicas para descartar la presencia de *H. capsulatum*.

En el momento del sacrificio todos los ratones fueron sangrados a blanco, el suero fue separado y con este se realizó búsqueda de anticuerpos anti-*H. capsulatum* utilizando pruebas de contraelectroforesis (CIEF) e inmunodifusión doble (IDD) frente a suero y antígeno específico de referencia (31)

Caracterización genética. La identificación definitiva de aislamientos fúngicos obtenidos fue realizada por producción de exoantígenos en medio líquido y conversión dimórfica (31)

Una vez identificados, los aislamientos del brote fueron caracterizados genéticamente y comparados con ocho aislamientos obtenidos entre el año 2000 y 2002 de casos clínicos autóctonos de la Provincia de Buenos Aires, área endémica más cercana al brote, (02932, 02934, 02935, 02926, 01842, 01744, 00205, 021196), un aislamiento de 1999 de un caso autóctono de la Provincia de Chaco; (993445) y tres aislamientos de Neuquén del año 2003 no involucrados en el brote (031830, 031839, 031842). Se incluyeron dos cepas de referencia: G186B (Panamá) y Downs (EEUU). La extracción del ADN fúngico y de la técnica de RAPD-PCR con los primers 1281-1283 se realizó utilizando la metodología previamente descrita por Zuiani et al (33). Las imágenes de los perfiles genéticos obtenidos fueron digitalizadas y comparadas con BioNumerics ver 5.1 (Applied Maths NV), utilizando el coeficiente de Dice.

Aspectos Educativos: Se mantuvieron reuniones con personal del HIZ, destacándose la importancia de la búsqueda de esta patología en pacientes con Neumonía Aguda de la Comunidad (NAC), en especial aquellas de etiología poco clara.

Se conversó con autoridades de Vialidad Nacional para recordar la importancia de las medidas de precaución del personal en relación a actividades de riesgo, tales como remoción de tierra y escombros.

Resultados

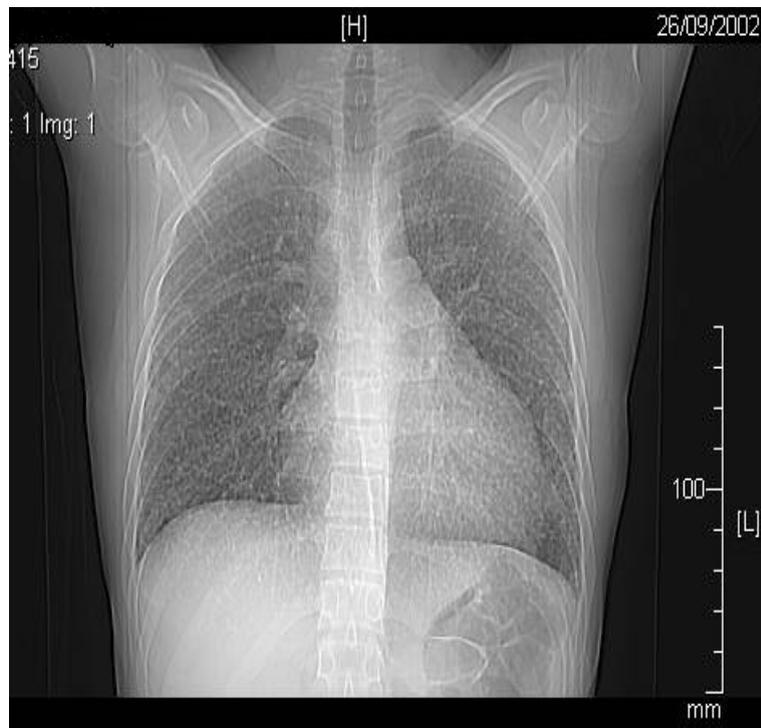
Hallazgos clínicos

Los pacientes eran todos de sexo masculino adultos sanos, sin enfermedades conocidas. El caso índice no presentaba antecedentes de relevancia, excepto fumador de 4 a 5 cigarrillos diarios desde hacía varios años y consumo de alcohol en forma moderada.

Los pacientes eran oriundos de la provincia de Neuquén y residían en la ciudad de Zapala (38° 90 S, 70° 06 O) ubicada a 183 km. de la Ciudad Capital de Neuquén y no tenían antecedentes de haber viajado fuera de la provincia. Eran desocupados ferroviarios afectados desde marzo de 2002 a un programa ocupacional vial. Habían realizado tareas en la ruta por nevada durante los meses de junio y julio, desmalezamiento de un descampado en el campamento de vialidad en Puente Picun Leufú durante igual período trabajando en grupos de 20 a 30 operarios. Las tareas más recientes fueron: limpieza de un alcantarillado pluvial a principios de agosto, el mismo se encontraba a 20 km de Zapala sobre la ruta 40 en dirección a Las Lajas (38° 78 S, 70° 22 O); recogieron piedras frente a Laguna Miranda, al pie del cerro Cansino (38° 88 S, 70° 30 O). En ese campamento de vialidad de Zapala tenían asignado una casilla donde convivían con otras dos personas un promedio de 4 hs por día, de lunes a viernes, desde el mes de marzo y con frecuencia limpiaban excretas de roedores.

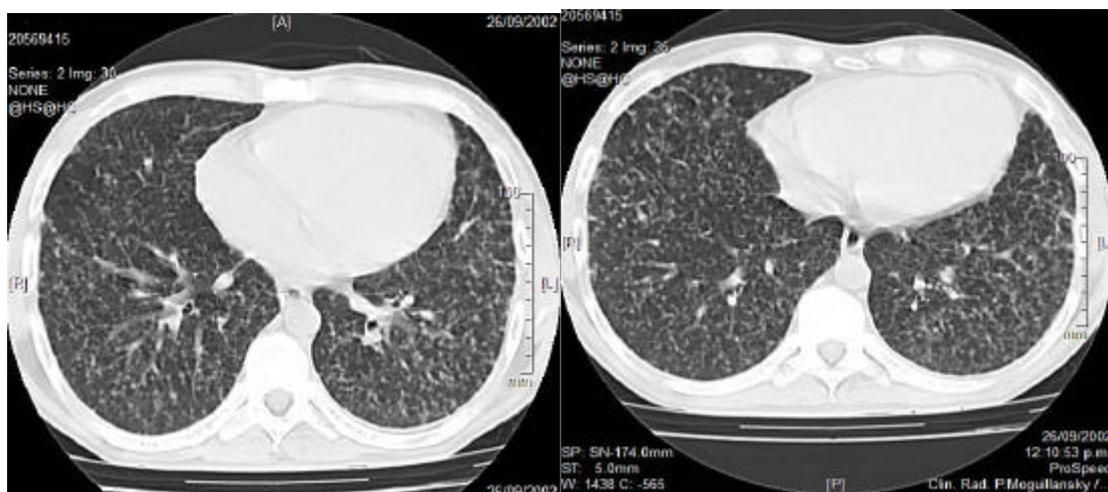
El caso índice fue internado el 18 de agosto de 2002 en el HIZ con antecedentes de mialgias de una semana de evolución, medicado con analgésicos. Al momento de la internación el paciente presentaba fiebre, escalofríos, cefalea intensa, dolor retro ocular, malestar general y disnea a esfuerzos moderados siendo medicado con analgésicos y antibióticos. Debido a la hipoxemia severa con infiltrados intersticiales bilaterales en la radiografía de tórax (**Fig.11**) se decide su derivación al HPN conjuntamente con otros tres pacientes que compartieron el trabajo, y presentaban síntomas similares. Un día después ingresaron al HPN los cuatro pacientes, dos al servicio de clínica médica y dos a terapia intermedia. Al ingreso estaban lúcidos, constatándose temperatura axilar de 38 °C en dos de ellos y febrícula en uno, estables desde el punto de vista hemodinámico. Los pacientes presentaban un síndrome gripal de 7 a 10 días de evolución con fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, malestar general, tos seca y disnea de intensidad variable. Todos presentaban taquipnea, con niveles de saturación de oxígeno (FIO₂ 21%) que variaban entre 90 % en el caso índice y 94- 95% en los tres restantes.

Figura 11.- Rx tórax



Las nuevas radiografía de tórax de los cuatro pacientes, tomadas en el HPN, mostraron infiltrados nodulillares intersticio-alveolares, diseminados en ambos campos pulmonares en forma más o menos homogénea en tres pacientes, en tanto, en el cuarto respetaba los vértices pulmonares. Se observó adenopatías en los hilios pulmonares, y ningún paciente presentó derrame pleural. Días después se realizó tomografía axial computada de tórax que mostró similitud con los hallazgos observados en las radiografías en todos los casos. La TAC de tórax sin contraste del caso índice mostró: “Múltiples imágenes nodulares distribuidas en ambos campos pulmonares desde los vértices hasta las bases. Algunas de ellas presentan aspecto alveolar, especialmente en la periferia pulmonar del lóbulo superior derecho e inferior izquierdo, claro patrón reticular. La condensación parenquimatosa periférica así como el refuerzo de la pleura en la cara lateral del hemitórax derecho correspondió a secuela de biopsia. No se detectó derrame pleural. Se observan adenomegalias mediastinales escasas y muy pequeñas en ambos hilios y adenopatías en regiones axilares. Los hallazgos tomográficos son similares a los observados en la radiología simple. Hacia las bases, señalamos nódulos densos, calcificados, de aproximadamente 8 mm de diámetro, que interpretamos como granulomas secuales” (**Fig. 12**).

Figura 12.- TAC de tórax



El caso índice fue derivado a la unidad de cuidados intensivos con insuficiencia respiratoria posterior a la realización de la biopsia pulmonar, presentando inestabilidad hemodinámica durante las primeras 72 hs, requiriendo asistencia respiratoria mecánica por 9 días y sostén inotrópico los primeros seis.

Los análisis de laboratorio mostraron discreta leucocitosis en un paciente, presencia de linfocitos reactivos en todos los casos y plaquetas normales. Sólo en uno las enzimas hepáticas estaban discretamente elevadas. En tres de ellos el tiempo de protrombina estaba alterado, al igual que los valores de LDH. La intradermorreacción con histoplasmina fue positiva en los cuatro, con valores entre 7 mm y 23 mm, en tanto que la PPD y coccidiolina fueron negativas.

La búsqueda de anticuerpos para diagnóstico de SPH, leptospirosis, coccidioidiomycosis y HIV fue negativa en los cuatro pacientes. La búsqueda de anticuerpos anti- *H. capsulatum* fue positiva en tres pacientes, siendo negativa en el que presentó menor sintomatología y menos evidencia de compromiso pulmonar en los estudios de radiológicos y tomográficos de tórax.

En el informe de anatomía patológica como el de microbiología describieron levaduras compatibles con *H. capsulatum* en diferentes tinciones. La observación microscópica fue confirmada en el Servicio de Micología del Hospital Muñiz de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Con este resultado se suspendió el tratamiento con doxiciclina y se comenzó el tratamiento sólo del caso índice con anfotericina B, de la cual recibió una dosis total de 825 mg y luego prosiguió con itraconazol 400 mg/día inicialmente y luego 300 mg/día. Durante su estadía en UTI, el paciente presentó insuficiencia renal aguda, derrame pleural y mayor

alteración de las enzimas hepáticas, finalmente fue dado de alta el 07 de septiembre de 2002, 20 días después, continuando el tratamiento externado durante 6 meses. Durante ese tiempo, el paciente presentó un cuadro febril sin que se documentara infección intrahospitalaria o infección intercurrente. Respondió parcialmente a antiinflamatorios no esteroides y se controló totalmente con corticoides por vía oral. Este último tratamiento se indicó al interpretarse el cuadro como síndrome de respuesta inflamatoria.

A los otros tres pacientes internados se les suspendió el tratamiento con doxiciclina y se los evaluó clínicamente hasta que el cuadro se auto limitó en forma espontánea pudiendo ser externados entre 5 y 7 días luego del ingreso, sin tratamiento antimicótico.

Un quinto paciente, compañero de tareas de los anteriores, fue citado en forma ambulatoria, concurriendo a la evaluación durante la primera semana de septiembre de 2002. Al interrogatorio refirió haber padecido un cuadro gripal similar al presentado por los otros cuatro pacientes: astenia, decaimiento, cefalea leve, mialgias generalizadas, sensación febril con escalofríos, odinofagia y tos seca, proceso que comenzó el 13 de agosto de 2002 y duró aproximadamente 5 días. La radiografía de tórax mostró imágenes nodulares, pequeñas, que podían corresponder a secuelas o afectación alveolar mínima con calcificaciones aisladas en el parénquima y adenomegalias en la región hiliar. La intradermoreacción con coccidiodina fue negativa, al igual que la PPD, en tanto la histoplasmina fue positiva (14 mm) y presentó anticuerpos anti-*H. capsulatum* en suero. Las principales características clínicas, radiológicas y de laboratorio de los cinco pacientes se resumen en la **Tabla 2**.

A partir del cultivo de la biopsia de pulmón y del hemocultivo del caso índice en agar Sabouraud a 25 °C desarrolló un hongo de micelio hialino que al examen microscópico presentó micelio fino ramificado con escasos macroconidios de 8-12 mm de diámetros con prolongaciones digitiformes y microconidios de 2-4 mm de diámetro. El hongo revirtió a levaduras después de sucesivos pasajes en agar BHI adicionado con cisteína a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%. Los antígenos extracelulares obtenidos a partir de cultivo estático presentaron las bandas H y M características de *H. capsulatum*. Las cepas se encuentran depositadas en la Colección de Cultivos del Departamento Micología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" con los números 042247 (acrónimo 4617 - hemocultivo) y 042248 (acrónimo 4621 - biopsia de pulmón). **Figura 13, 14, 15 y 16.**

Figura 13.- Cultivos fase levaduriforme y micelial



Figura 14.-Disgregado de cultivo de Histoplasma, forma filamentosa con azul de lactofenol 400X.

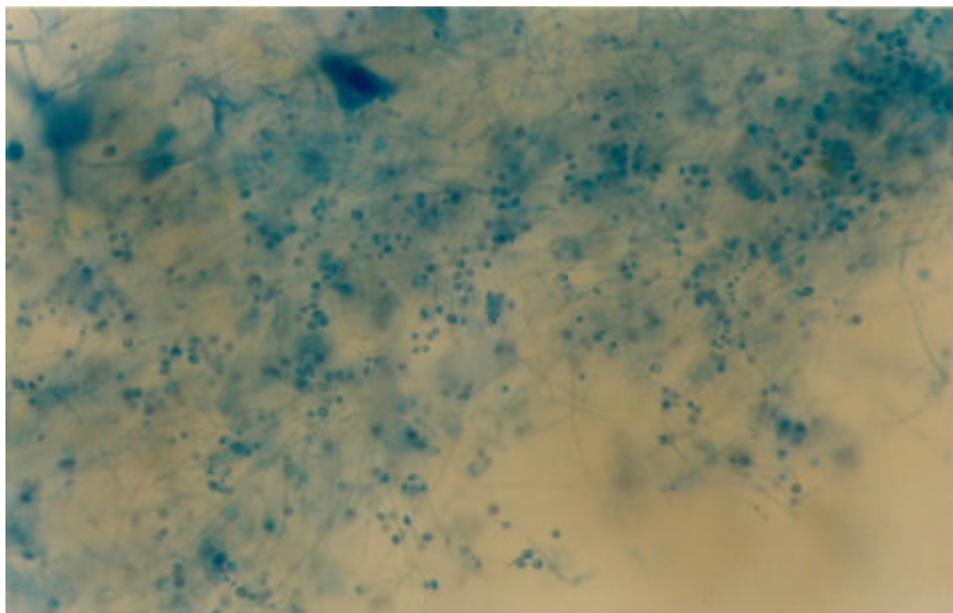


Figura 15.- Disgregado de cultivo de Histoplasma fase levaduriforme con azul de lactofenol 400X.

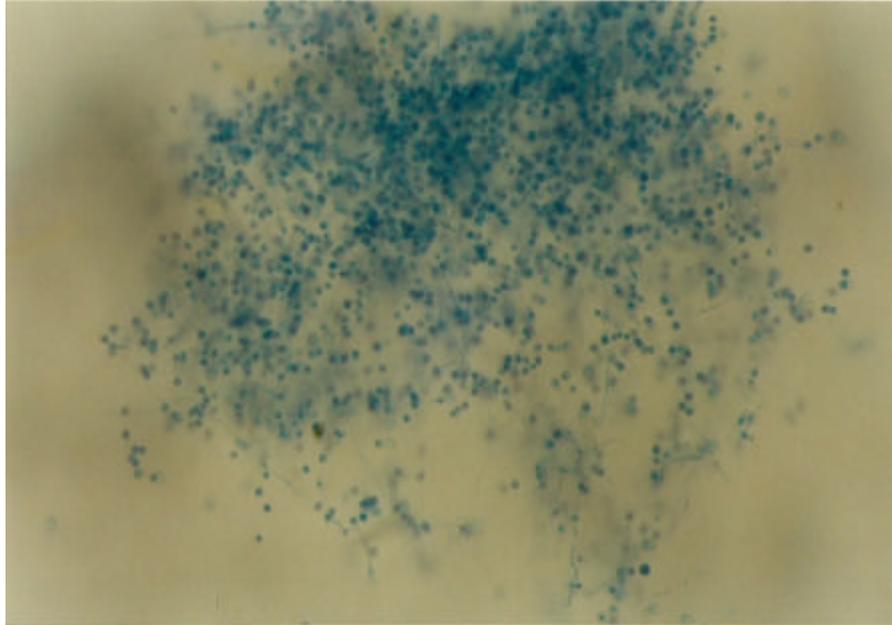


Figura 16.- Extendido de biopsia de pulmón de caso índice. Coloración de Grocott 1000 x.

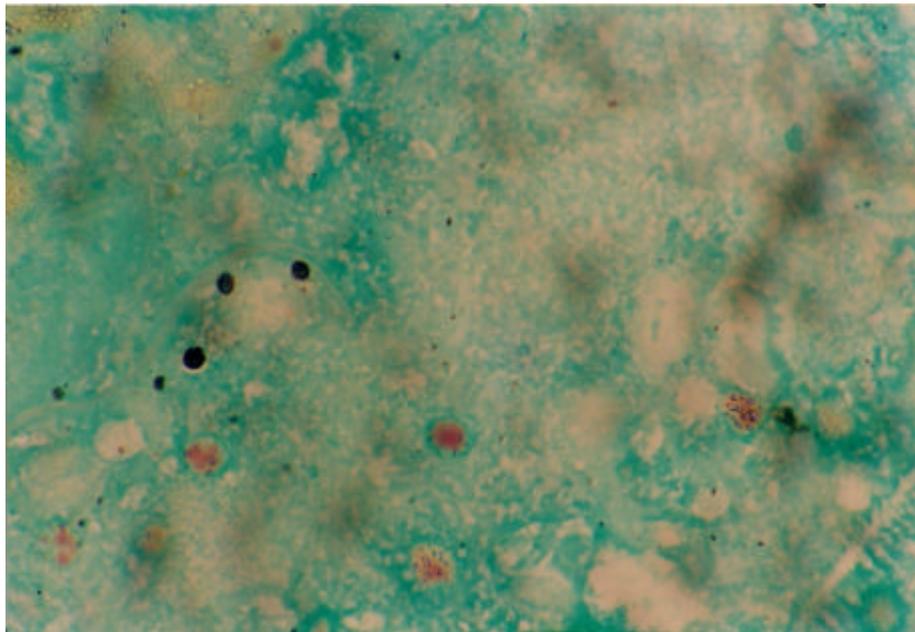


Tabla 2.- Resumen de las características clínicas, radiológicas y de laboratorio de los cinco pacientes involucrados en el brote de histoplasmosis

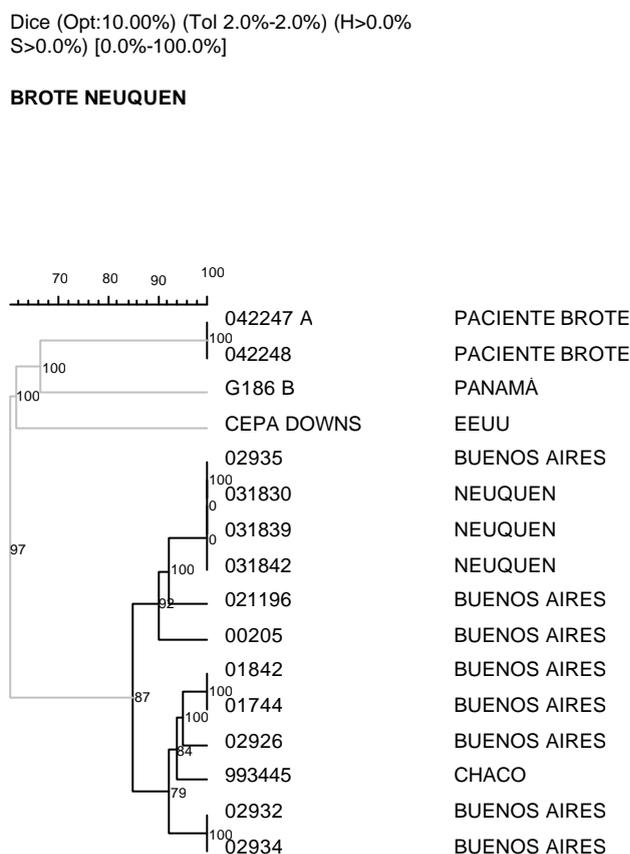
	CASO ÍNDICE	PACIENTE 2	PACIENTE 3	PACIENTE 4	PACIENTE 5
Edad	33	24	26	47	29
Sexo	M	M	M	M	M
Internación (días)	Si (20)	Si (5)	Si (5)	Si (5)	no
DATOS CLINICOS					
Síndrome gripal	+	+	+	+	+
Mal estado general	+	+	+	+	+
Mialgias	+	+	+	+	+
Cefalea	+	+	+	+	+
Tos seca	+	+	+	+	NI
Fiebre (°C)	+	+	+	+	NI
Escalofríos	+	+	+	+	+
Taquipnea e hipoxemia	Grave	Leve	Leve	Leve	No
DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES					
Rx de tórax	imagen nodulillar diseminada con patrón reticular compromiso intersticio alveolar y adenopatías hiliares	imagen micronodulillar dispersa con patrón alveolar	Adenopatías hiliares. imagen micronodulillar con patrón alveolar	Adenopatías hiliares. imagen micronodulillar dispersa con patrón alveolar	Adenopatías hiliares. imagen micronodulillar dispersa con patrón alveolar
LABORATORIO					
GPT	? 5 VMN*	? 3 VMN*	NR	NR	NR
LDH	? 1.5 VMN*	? 2 VMN*	? 1.5 VMN*	NR	NR
T Quick	64%	58%	NR	53%	NR
Hemograma	leucocitosis c/ LR	LR	LR	leucocitosis c/ LR	NR
Intrademorreacción con histoplasmina (mm)	15	21	7	23	14
Inmunodifusión para <i>Histoplasma capsulatum</i>	+	+	+	-	-
ED y Cultivo de biopsia pulmón y hemocultivo	<i>H. capsulatum</i>	NR	NR	NR	NR
TRATAMIENTO					
ARM	si	No	no	no	no
Oxigenoterapia	no	Si	si	si	no
FIO2	90				
Antifúngico	AMB-ITZ	NR	NR	NR	NR

LDH: láctico deshidrogenasa, TP: tiempo de protrombina, ARM: asistencia respiratoria mecánica, FIO2: Concentración de oxígeno en el aire inspirado, NI: no informada, NR: no realizada, LR: linfocitos reactivos, AMB-ITZ: anfotericina B - itraconazol. *valor máximo normal

Hallazgos genéticos

El análisis de los perfiles genéticos mostró que las cepas del paciente involucrado en el brote presentaban 60 % de homología con el resto de las cepas de pacientes argentinos, 62 % y 68 % de homología con las cepas G186B y Downs respectivamente (**Figura 8**).

Figura 8.- Dendrograma originado a partir de los polimorfismos del ADN de *H. capsulatum* obtenidos con los primers 1281-1283. Se señala a la derecha de la figura el origen geográfico de los aislamientos. Las cepas 042247 (hemoculivo) y 042248 (biopsia de pulmón) corresponden a las aisladas del caso índice. Se incluyeron dos cepa de referencia: Downs y la G186B. El análisis fue realizado BioNumerics ver 5.1 (Applied Maths NV), utilizando el coeficiente de Dice



Hallazgos ambientales

En los lugares visitados en las dos salidas para realizar estudios de campo, y ya conociendo que el diagnóstico de los pacientes era histoplasmosis pulmonar, llamó la atención a los integrantes del grupo interdisciplinario involucrado las características de la zona: desértico, seco, ventoso, tan diferente a las áreas endémicas descritas para el *Histoplasma capsulatum*.

En el primer estudio ambiental se tomó muestras de suelo de lugares abiertos asociados o no a excretas de aves y/o murciélagos, al igual que plumas de aves. En la alcantarilla se muestreó parte de la tierra removida por los obreros luego de una aluvión ocurrido a principio de agosto. Ninguna de las muestras cultivadas resultó positiva para *H capsulatum*.

En el interior de las cavernas visitadas en el segundo estudio ambiental no se observaron murciélagos ni guano de estos mamíferos, a pesar de que los lugareños relatan la existencia de quirópteros en la zona en los meses estivales (octubre a marzo).

Ninguno de los 15 ratones centinela ni los 190 ratones inoculados con suelo desarrolló la enfermedad, ni presentó alteraciones macroscópicas en la necropsia y tampoco pudo aislarse *H. capsulatum*. Las pruebas de contrainmunolectroforesis (CIEF) e inmunodifusión (IDD) fueron negativas, excepto en los ratones inoculados con la muestra rotulada V14 (alcantarilla oeste, ruta nacional 22-40, 22 Km, 38° 78 S, 70° 22 O). El suero de los ratones inoculados con esta muestra formó una banda en la CIEF y una banda de identidad parcial frente al suero y antígeno de referencia de *H. capsulatum* con la técnica de IDD.

La Subsecretaría de Salud elaboró un alerta en Diciembre de 2002, informando al personal de salud de la provincia, acerca de estos hallazgos, remarcando la importancia de la búsqueda de histoplasmosis en pacientes con NAC, en especial aquellas de etiología no clara, como así también sobre la importancia de prevención en relación a actividades laborales que impliquen riesgo para los operarios.

Discusión

Los casos de histoplasmosis aguda asociados a exposición ocupacional son descritos con frecuencia en los EEUU (26,34, 35,36) y México (37). Con anterioridad a la comunicación de este brote (38) no se había descrito otros. En años posteriores fueron notificados nuevos brotes en la Provincia de Buenos Aires (39) y (40, 41)

En este trabajo se describe el cuadro clínico y hallazgos de laboratorio de cinco pacientes involucrados en un brote de histoplasmosis asociado a exposición laboral en la Patagonia Argentina, un área no endémica de esta micosis. Los individuos formaban parte de una cuadrilla que se ocupaba de diferentes tareas en el mantenimiento de caminos provinciales. Todos eran residentes de la zona geográfica y no tenían antecedentes de haber visitado otras áreas del país.

Solo un paciente requirió tratamiento específico (caso índice) probablemente debido a causas inherentes al individuo o a una mayor exposición al microorganismo (5). Al interrogatorio surgió el dato de que el caso índice fue el primero en palear tierra para despejar el alcantarillado, y fue el que más tiempo estuvo en contacto con la tierra liberada. Los restantes cuatro individuos tuvieron una sintomatología leve, no requirieron medicación y fueron internados por precaución debido a las características clínicas del caso índice. Ninguno de los operarios utilizó en ninguno de los trabajos mencionados, equipo de protección.

El hecho de que ninguno de los pacientes hubiera salido de la zona del brote, confirma la presencia de *H. capsulatum* en la provincia patagónica de Neuquén aunque, el hongo, no pudo ser aislado del ambiente. Los individuos adquirieron la infección removiendo la tierra de la alcantarilla del km 20 de la ruta 40, esto pudo confirmarse a través de la detección de anticuerpos anti-*Histoplasma* en los ratones inoculados con la tierra obtenida en el lugar. Los primeros estudios de campo se realizaron casi un mes después de la exposición de los

pacientes, en ese tiempo la tierra que los operarios habían removido estuvo expuesta a las inclemencias del clima de la zona y al sol que tal vez inactivó y/o disminuyó la carga de conidios de *H. capsulatum*. Esto pudo ser la causa por la que el hongo no pudo aislarse del suelo, no obstante, el sistema inmune de los ratones detectó los antígenos fúngicos.

Actualmente, se han informado casos autóctonos de histoplasmosis en los cinco continentes. La mayoría de los brotes de histoplasmosis se observan en Centro y Norte de América (5). En Sudamérica se han descrito brotes en Colombia (43) y en varios estados de Brasil incluyendo el Estado de Rio Grande del Sur (44, 45, 46, 47, 25).

En Argentina, la histoplasmosis es endémica en la llanura pampeana, los valles fértiles precordilleranos del noroeste y en el noreste también se han detectado casos autóctonos. La región donde ocurrió el brote aquí documentado se asienta sobre una meseta basáltica, correspondiente a la Patagonia pre andina, 1050 metros sobre el nivel del mar entre el paralelo 38° y 39° de latitud sur (48). El clima es semi-árido y frío propio de la estepa patagónica, con gran amplitud térmica; veranos con temperatura media de 22 °C e inviernos con temperatura media de 6° C (48). Se sabe que *H. capsulatum* puede crecer a estas temperaturas (6), sin embargo, la precipitación promedio anual en esta zona es de 200 a 300 mm anuales (49), un valor muy inferior a la necesaria para el crecimiento del hongo que es de 1000 mm anuales (3). Los suelos son pobres de texturas franco arenosa y arcillosas, con moderada a escasa materia orgánica (49), muy diferentes a los suelos fértiles con alto contenido de nitrógeno y fosfatos requeridos por *H. capsulatum* (3).

En el área de Zapala ocurren nevadas de 50 cm entre los meses de mayo y septiembre, además soporta fuerte vientos predominantes del Oeste y Sudoeste entre los meses de agosto y octubre, con velocidad promedio de 45 Km/h con ráfagas que suelen alcanzar los 180 Km/h (49).

Es conocido que los desbordamientos de los ríos y la presencia de piedra caliza en el suelo son factores que pueden influir en la epidemiología y la diseminación de la histoplasmosis. En este sentido a principio de agosto de 2002 ocurrió una gran nevada en toda la zona de la cordillera cercana y en la zona de Zapala y Las Lajas la nieve llegó a los 10 cm y la temperatura descendió a -10 °C (50). Esto fue seguido de un deshielo que aumentó el caudal de los ríos, con la consecuente aparición de aluviones. Uno de estos aluviones fue el que muy probablemente selló la alcantarilla en la ruta, y la tierra proveniente del mismo fue removida por los operarios. Es posible que el aluvión proviniera de la zona serrana del oeste de la ruta, y esto explicaría la razón por lo que en el segundo estudio de campo se buscó el nicho ecológico en los sistemas cavernarios, siendo estos ambientes más propicios para que el hongo sobreviva en condiciones adversas (6, 37) y sin embargo no se pudo aislar el hongo. En la inspección ocular de los sistemas cavernarios visitados, no se encontraron murciélagos, aves, ni cúmulos

de guano de éstos, a pesar de haber hecho la visita en meses de primavera y verano austral, época en que según referencias de los lugareños suelen encontrarse estos animales.

Una expansión de la histoplasmosis a límites boreales fue informado en 2002; en ese año ocurrió un brote de la enfermedad en Alberta, Canadá, asociada a remociones de tierra en un campo de golf (51). El brote ocurrido en Alberta y el aquí descrito extendieron el área de brotes epidémicos ocasionados por *H. capsulatum* en América desde 45° (29) a 50 ° de latitud norte y desde 30° (2) a 38° de latitud sur, respectivamente, asociando la enfermedad a zonas donde se creía que el hongo no podía sobrevivir. En climas inclementes, probablemente, *H. capsulatum* ocupe micronichos en los cuales permanece cuando las condiciones son adversas. Esto fue sugerido por otros autores que registraron brotes asociados a microambientes (30, 5).

Trabajos previos utilizando diversos marcadores moleculares demostraron una alta homología entre los aislamientos clínicos y ambientales de Argentina (42). Inclusive, estudios de secuencias génicas demostraron que las cepas argentinas tienen un origen clonal (47). El hecho que el perfil genético de la cepa involucrada en el brote de Neuquén presente un perfil genético diferente del resto de las cepas argentinas analizadas, nos hace pensar que puede ser una cepa introducida, probablemente por murciélago, ya que se conoce que estos mamíferos son reservorios y potenciales dispersores de *H. capsulatum* en la naturaleza (6). Si bien la meseta patagónica presenta temperaturas ambientales poco favorables para los murciélagos, sobre todo en época invernal, las alteraciones ocasionadas por el cambio climático global pudieron estar influenciando el desplazamiento de estos animales desde zonas tropicales a latitudes cada vez más australes dispersando el hongo.

Otra posibilidad es que se trate de un genotipo de *H. capsulatum* restringido y autóctono de la zona geográfica, que no se aísla con frecuencia, hecho que fue observado en el Estado de Goias, Brasil (53). Sin embargo, en el Centro Nacional de Referencia ANLIS, el estudio de otros cuatro aislamientos de pacientes de Neuquén tuvo un perfil coincidente con el genotipo argentino y diferente al del brote. Estos cuatro pacientes eran HIV + y no tenemos certeza de que hayan adquirido la infección por histoplasma en la provincia, probablemente hayan sufrido una reactivación de una infección adquirida previamente en las áreas endémicas en Argentina. Para determinar si la cepa involucrada en el brote de Neuquén es un genotipo autóctono o introducido sería necesario analizar un número elevado de aislamientos de pacientes con histoplasmosis de la provincia de Neuquén y de otras regiones geográficas de Argentina, con el fin de caracterizar los genotipos de *H. capsulatum* circulantes en el Cono sur de América.

En nuestro país la histoplasmosis es considerada un enfermedad ocupacional para “Trabajadores de bodegas, cuevas o edificios viejos abandonados” (54). El brote aquí informado se asoció a trabajadores viales que removieron tierra en un lugar donde *H. capsulatum* no tendría un hábitat favorable. Profesionales de salud involucrados en el estudio de este brote tuvieron la posibilidad de reunirse con autoridades zonales de vialidad, para realizar las

recomendaciones correspondientes para la prevención de infecciones del personal a partir de exposición a material potencialmente contaminado.

El hecho debe alertar al personal de atención primaria de la salud a incluir la histoplasmosis como diagnóstico diferencial en pacientes con enfermedad respiratoria de etiología no determinada que hayan manipulado o removido tierra contaminado o no con guano, en espacios cerrados y/o abiertos, inclusive en áreas donde la enfermedad no es considerada endémica. La Subsecretaría de Salud Pública de la Provincia de Neuquén elaboró un alerta a raíz de los hallazgos de este estudio de brote, en diciembre de 2002.

Conclusiones

- Los pacientes derivados del HIZ con cuadro de NAC y diagnóstico presuntivo de SHP presentaron histoplasmosis.
- Fue el primer brote asociado a exposición laboral documentado en Argentina.
- Se pudo demostrar la presencia de histoplasmosis autóctona en la provincia de Neuquén.
- El *H. capsulatum* aislado en nuestra provincia es diferente al hallado en otras regiones de la Argentina con micosis endémica por este hongo.
- En Neuquén, la histoplasmosis debe ser tenida en cuenta como un diagnóstico diferencial en pacientes con cuadros de neumonía aguda de la comunidad, de etiología no clara.
- Los operarios que realicen tareas que conlleven riesgo de inhalación de esporas, tales como remoción de tierra, escombros, entre otros, deberán utilizar elementos de protección personal.

Bibliografía

1. Outbreak of Histoplasmosis Among Travelers Returning From El Salvador-Pennsylvania and Virginia, 2008. *MMWR* December 19, 2008, Vol 57, nº 50
2. Roberto Arenas Guzmán. Sección IV. Micosis Sistémicas. 17. Histoplasmosis. En *Micología Médica Ilustrada* - Segunda edición. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 2003; 163-171
3. Ripon John W. Capitulo 15. Histoplasmosis. En Ripon John W Editor. *Tratado de micología médica*. Mexico: Editorial Nueva Editotial Interamericana, 1990; 411-456.
4. Paola Nasta, Alessandra Donisi, Anna Cattane, Alessandro Chiodera, and Salvatore Casari. Acute Histoplasmosis in Spelunkers Returning from Mato Grosso, Peru. *J Travel Med* 1997; 4:176-178
5. Cano MV, Hajjeh RA. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin Respir Infect* 2001; 16(2):109-18.
6. Gerald L.Hoff, William J. Bigler. The Role of Bats in the Propagation and Spread of Histoplasmosis: A Review. *Journal of Wildlife Diseases* Vol. 17, Nº 2, April, 1981.
7. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev* 2007 Jan;20(1):115-32.
8. Ricardo Negroni. Clinical spectrum and treatment of classic histoplasmosis. .In: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.). *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, 2000.
9. R.Negroni, A.I. Arechavala, E.I.Maiolo. Histoplasmosis clásica en pacientes inmunocomprometidos. *Med Cutan Iber Lat Am* 2010; 38(2):59-69.
10. Pablo Negroni. Ricardo Negroni. Histoplasmosis. En *Micosis Cutáneas y Viscerales*. Lopez Libreros Editores. Octava Edición. 1984.
11. Marcelo S Ferreira e Aécio S Borges. Histoplamose. Histoplasmosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(2):192-198, mar-abr, 2009.
12. Steven W. Lenhart, Millie P. Schafer, Mitchell Singal, Rana A. Hajjeh. *Histoplasmosis. Protecting Workers at Risk*. Revised Edition. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. National Institute for Occupational Safety and Health. National Center for Infectious Diseases. December 2004.
13. Rubinstein P, Negroni R. Histoplasmosis. En: Rubinstein P, Negroni R, Editores. *Micosis Broncopulmonares del Adulto y del Niño*. Buenos Aires: Ed. Beta, 1981; 249-90.
14. Bianchi M, Robles AM, Vitale R, Helou S, Arechavala A, Negroni R. The usefulness of blood culture in diagnosing HIV-related systemic mycoses: evaluation of a manual lysis centrifugation method. *Med Mycol* 2000 Feb; 38(1):77-80
15. Kaufman CA. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:421-425.
16. Juliette Morgan, Maria V. Cano, Daniel R. Feikin, Marueen Phelan, Oscar Velazquez Monroy, Pablo Kuri Morales, Joseph Carpenter, Andre Weltman, Peter G. Spitzer, Hans H. Liu, Sara A. Mirza, David E. Bronstein, Daniel J. Morgan, Laura A. Kirkman, Mary E. Brandt, Naureen Iqbal, Mark D. Lindsley, David W. Warnock and Rana A. Hajjeh for The Acapulco HIstoplasmosis Wordking Group. A Large Outbreak of Histoplasmosis Among American Travelers Associated With a Hotel in Acapulco, Mexico, Spring 2001. *Am J Trop Med Hyg* 69(6), 2003, pp 663-669
17. L. Joseph Wheat, Alison G. Freifeld, Martin B. Kleiman, John W. Baddley, David S. McKinsey, James E. Loyd, and Carol A. Kauffman. Clinical Practice Guidelines for the Management of Patients with Histoplasmosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45: 807-25.
18. Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusano G, Gorodner J Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996; 38: 349-353.
19. Marticorena B.E, Borletto N, Negroni R Estudio de un área endémica de micosis profundas en el norte de la Provincia de Córdoba. *Rev Arg Micología* 1991; 14: 20-23.
20. Masih D, Marticorena B, Borletto N, Fariás C, Negroni R Epidemiologic study of bronchopulmonary mycosis in the Province of Córdoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1987; 29: 59-62.
21. Negroni R, Robles AM, Arechavala A Histoplasmosis progresiva Estudio en un lapso de 10 años. *Rev Arg Micología* 1994; 17: 14-21.
22. Rodríguez de Marengo ZJ, Araujo AC, Negroni R, Dubra F, Garcia OE. Encuesta epidemiológica de Histoplasmosis en la provincia de Salta. *Rev Arg Micología* 1979; 2: 5-10.

23. 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 Tucuman. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 206-10.
24. Weisburd GJ. Encuesta Nacional de Histoplasmosis *Rev.Arg Micología* 1995; 18: 5-7
25. Severo LC, Oliveira FM, Irion K, Porto NS, Londero AT. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2001; 43(4): 183-187.
26. Gregory D. Huhn, Connie Austin, Mark Carr, Diana Heyer, Pam Boudreau, Glynnis Gilbert, Terry Eimen, Mark D. Lindsley, Salvatore Cali, Craig S. Conover, and Mark S. Dworkin. Two Outbreaks of Occupationally Acquired Histoplasmosis: More than Workers at Risk. *Environment Health Perspectives* Vol 113/ Number 5/ May 2005.
27. Carlos Manuel Fernández Andreu, Gerardo Martínez Machín, María Teresa Illnait Zaragozí, Mayda Rosa Perurena, Lancha y Leonila González. Brotes de Histoplasmosis ocupacional en la provincia La Habana. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. *Rev Cubana Med.Trop* 2010; 62 (1):68-72
28. M.G.Stobierski, C.J.Hospedales, W.N.Hall, B.Robinson-Diumm. D.Hoch and D.A. Sheill. Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993. *J Clin Microbiol* 1996, 34(5):1220.
29. Lázaro ME, Resa A, Barclay C, Calanni L, Samengo L, Martínez L, Padula P, Pini N, Lasala M, Elsner B, Enria D. Síndrome pulmonar por hantavirus en el sur andino argentino. *Medicina* (Buenos Aires) 2000; 60:289-301.
30. Taylor ML, Ruíz-Palacios GM, del Rocio Reyes-Montes M, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Alvarez RO, Roldán-Aragón YA, Romero-Martínez R, Sahaza-Cardona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval GR. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45(3): 435-41
31. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editors. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. pp. 464-513.
32. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Disposición N° 6344 [http:// www.fcv.unl.edu.ar/bioterio/guias/ANMAT6344.pdf](http://www.fcv.unl.edu.ar/bioterio/guias/ANMAT6344.pdf) consultada 12/01/2010.
33. Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. Aislamientos de *Histoplasma capsulatum* con morfología aberrante obtenidos en la República Argentina *Rev Argent Microbiol* 2006; 38(2):79-83.
34. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of histoplasmosis among industrial plant workers-Nebraska, 2004. *MMWR* 2004; 53(43):1020-2.
35. Sorley DL, Levin ML, Warren JW, Flynn JP, Gersensblith. Bat-associated histoplasmosis in Maryland bridge workers. *Am J Med* 1979; 67(4):623-6.
36. Stobierski MG, Hospedales CJ, Hall WN, Robinson-Dunn B, Hoch D, Sheill DA. Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993 *J Clin Microbiol* 1996; 34(5):1220-3
37. Taylor ML, Granados J, Toriello C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 1996; 39(9-10):375-9
38. L.Calanni, G. Schmidt, C. Dell'Ali, R. D'Angelo, S. Brasili, C. Lopez, J. Fínquelevich, R. Negroni Brote de Histoplasmosis Asociado a Exposición Laboral en Neuquén, Argentina XI Congreso Panamericano de Infectología de la API, III Congreso Argentino de Infectología de la SADI, II Congreso Interamericano de la SIC, III Congreso Panamericano de SIDA. Córdoba, Argentina, 11 al 14 de Mayo de 2003.
39. R. Negroni, R Duré, A. Ortiz Nareto, A. I. Arechavala, E.I.Maiolo, G.M.Santiso, C. Iovannitti, B. Ibarra-Camou, C.E. Canteros. Brote de histoplasmosis en la Escuela de Cadetes de la Base Aérea de Morón, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; 42:254-2060.
40. Fínquelevich J, Tula L, Gonzalez F, Celia L, Cervoza R, Spina F, Iovannitti C. 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.
41. Castan V, Gilmore B, Piñón M, Ylan N, Fínquelevich J, Iovannitti C. Estudio Micológico de muestras de tierra del Pueblo de Cortines, Provincia de Buenos Aires. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires 17 al 21 de Octubre de 2004
42. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, Snaiderman L, Martínez M, Paladino M, Cicuttin G, Varela E, Alcoba E, Zuiani F, Sahaza JH, Taylor ML, Davel G. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de **murciélago** urbano *Eumops bonariensis* *Rev Argent Microbiol* 2005; 37(1):46-56.

43. Jiménez RA, Urán ME, de Bedout C, Arango M, Tobón AM, Cano LE, Restrepo A. Outbreak of acute histoplasmosis in a family group: identification of the infection source. *Biomedica* 2002; 22(2):155-9.
44. Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AG, Hobaika AB. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(5):483-6.
45. Oliveira FM, Unis G, Severo LC. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(4):375-8.
46. Netto CF, Neto JM, Guerra MA, Costa EO Histoplasmose epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1976; 18(2):108-12.
47. Peçanha Martins AC, Costa Neves ML, Lopes AA, Querino Santos NN, Araújo NN, Matos Pereira K. Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(2):103-6.
48. Gobierno de la Provincia del Neuquén Municipalidad de Zapala, Geografía <http://www.zapala.gov.ar/geografia.htm> consultada 12/09/2009
49. Bran, D.; Ayesa, J.; y López, C. Áreas ecológicas de Neuquén - Laboratorio de Teledetección - INTA Bariloche, 2002 <http://www.inta.gov.ar/bariloche/nqn/ae/m08.htm> , consultada 20/02/2010
50. Río Negro Online. La nevada creó un caos en la ruta 237 y en Piedra del Águila, 6/08/02 en <http://www.rionegro.com.ar/arch200208/s06g05.html> , <http://www1.rionegro.com.ar/edicionesAnteriores/Titulares%20del%206%20de%20agosto%20de%202002.htm> consultada 12/12/2009
51. Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstiuik C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S. Histoplasmosis cluster, golf course, Canada *Emerg Infect Dis* 2006; 12(1):163-5.
52. Kasuga, T., T. J. White, G. Koenig, J. McEwen, A. Restrepo, E. Castaneda, L. C. Da Silva, E. M. Heins-Vaccari, R. S. De Freitas, R. M. Zancopé-Oliveira, Z. Qin, R. Negroni, D. A. Carter, Y. Mikami, M. Tamura, M. L. Taylor, G. F. Miller, N. Poonwan, and J. W. Taylor. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 12: 3383-3401
53. Zancopé-Oliveira RM, Morais e Silva Tavares P, Muniz MM Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45(3):443-9.
54. Ministro de trabajo y seguridad social. Decreto 658/1996. Listado de enfermedades profesionales http://www.safjp.gov.ar/digesto_2/Index/Normas/DECRETOS/dec_658_96.htm consultada 12/12/2009

Agradecimientos

A la Dra. Cristina Canteros por su apoyo incondicional desde el inicio del estudio de este brote, permitiéndonos compartir su vasta experiencia en esta patología y alentándonos incansablemente a documentar por escrito esta experiencia.

Al Dr. Jorge Finkelievich, excelente profesional y querido amigo. Por sus aportes invalorable en el manejo de los pacientes, en el diagnóstico clínico y epidemiológico del brote, y por facilitarnos una vez más todo lo que está a su alcance para que la micología pueda ser practicada con la mayor excelencia en nuestra provincia.

Al Dr. Ezequiel Klimovsky, porque con su ejemplo me estimuló a estudiar cada día más esta maravillosa disciplina, la investigación clínica.

Al Profesor Dr. Ricardo Negroni, mi maestro, porque me enseñó a amar esta apasionante especialidad, la micología médica.

Al Dr. Pablo Bazerque, pionero en investigación clínica farmacológica en latinoamérica, quién con su ejemplo mostró que en nuestro país esa actividad se puede realizar cada día con mayor nivel académico.

A la Dra. Ana Rufina Pérez (Lucy), médica infectóloga del Servicio de Infectología del Hospital Provincial Neuquén y amiga. Por su paciencia, su perseverancia, su generosidad, por su ayuda permanente e invaluable.

A la Dra. Graciela Schmidt, que hoy goza de una merecida jubilación, hasta hace unos años bioquímica a cargo del sector de micología del área de microbiología del HPN. Por su compromiso, su permanente disponibilidad, su profesionalidad, y el cálido recuerdo de tantos años de tarea compartida para que la micología tuviera en la institución el lugar que siempre mereció.

A la Dra. Susana Brasili, bioquímica a cargo del sector de micología del área de microbiología del HPN. Por su dedicación, profesionalidad, por brindarnos diariamente el fruto de su minuciosa labor, y por el afecto y apoyo que me ha brindado.

A los Dres. César Dell'Ali y Roberto D'Angelo, del Servicio de Clínica Médica del Hospital Provincial Neuquén. Por la ayuda recibida en el estudio inicial del brote.

A la Dra. Claudia López, médica de Epidemiología de la Subsecretaría de Salud de la Provincia de Neuquén, por la colaboración brindada en el estudio de campo.

Al personal de salud del Hospital Interzonal de Zapala.

Al personal de la Zona Sanitaria II de la Provincia de Neuquén.

A los profesionales de Epidemiología de Nación que colaboraron en el 2002 en el estudio de este brote.

A la Dra. María Fernanda Zuiani, colaboradora de la Dra. María Cristina Canteros en el Departamento Micología, INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires.

Al Dr. Jorge Calabrese, querido colega y médico de Tres Arroyos, por su apoyo en la búsqueda bibliográfica.