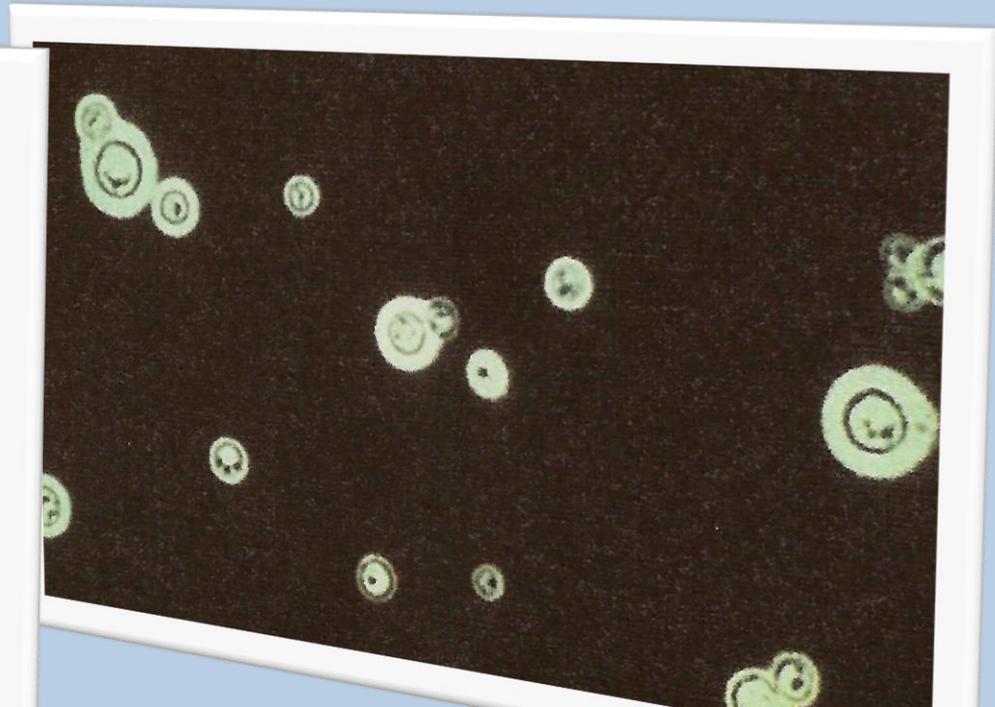
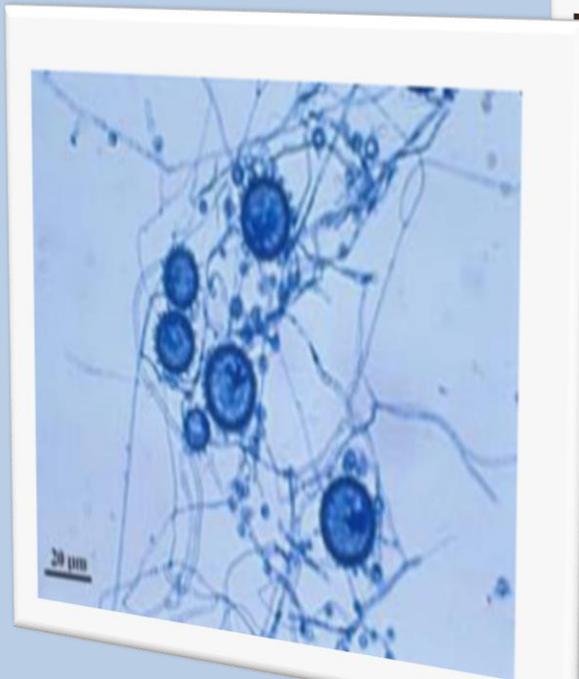


FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO CLÍNICO
ASIGNATURA: MICOLOGÍA

UNIDAD 4: MICOSIS SISTÉMICAS

TEMA: *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Características del hongo, enfermedad que produce y diagnóstico de laboratorio



Cryptococcus neoformans

agente etiológico de la

CRIPTOCOCOSIS

micosis de curso subagudo o crónico que puede presentar diferentes manifestaciones clínicas

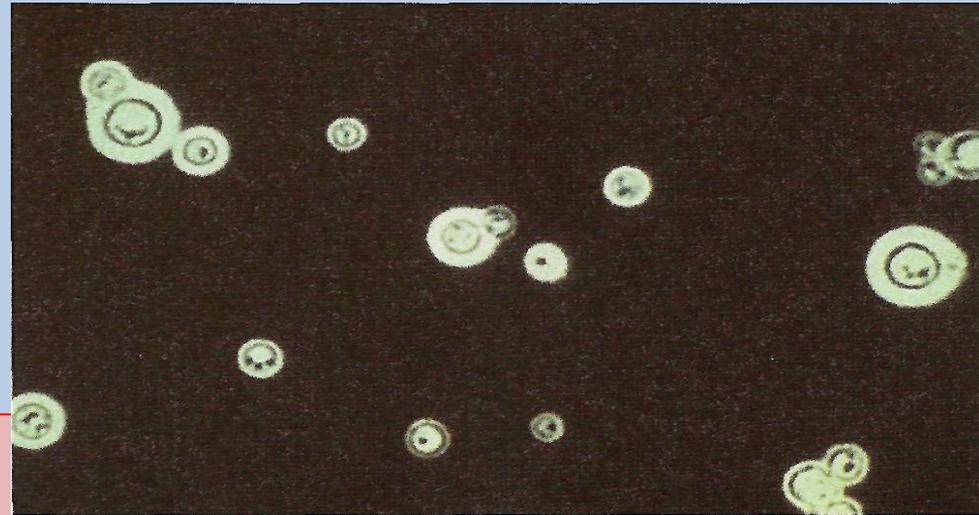
más del 75 % de los casos se localizan en el Sistema Nervioso Central

Se distinguen:

- ✓ cinco serotipos: (A, B, C, D y AD)
- ✓ dos variedades:
 - ◆ *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D y AD)
 - ◆ *C. neoformans* var. *gatti* (serotipos B y C).

es una levadura encapsulada

- ❑ Presenta una distribución universal
- ❑ Se desarrolla como saprófito ubicuo del suelo, en especial enriquecido con excrementos de paloma.



Preparación de *Cryptococcus neoformans* en tinta china que revela la llamativa cápsula que circunda a las levaduras de gemación

Epidemiología

- ❑ *C. neoformans* var. *neoformans* tiene una distribución universal relacionada con suelo contaminado por excrementos de ave
- ❑ *C. neoformans* var. *gatti* se encuentra en climas tropicales y subtropicales en asociación con árboles del género *Eucalyptus*.
- ❑ no se transmite de persona a persona, ni de animal al hombre, ni entre animales. Tampoco se han informado brotes epidémicos en humanos por exposición simultánea a una fuente común.
- ❑ Todas las edades son susceptibles, aunque se ha presentado con mayor prevalencia entre los 20 y 50 años.
- ❑ Es mucho más frecuente en el hombre que en la mujer, lo que se ha atribuido, al igual que en otras micosis, al efecto inhibitorio de los estrógenos sobre algunas especies fúngicas.
- ❑ No se ha encontrado predilección por determinada raza u ocupación, ya que son los factores predisponentes del hospedero los que determinan el curso de la infección.

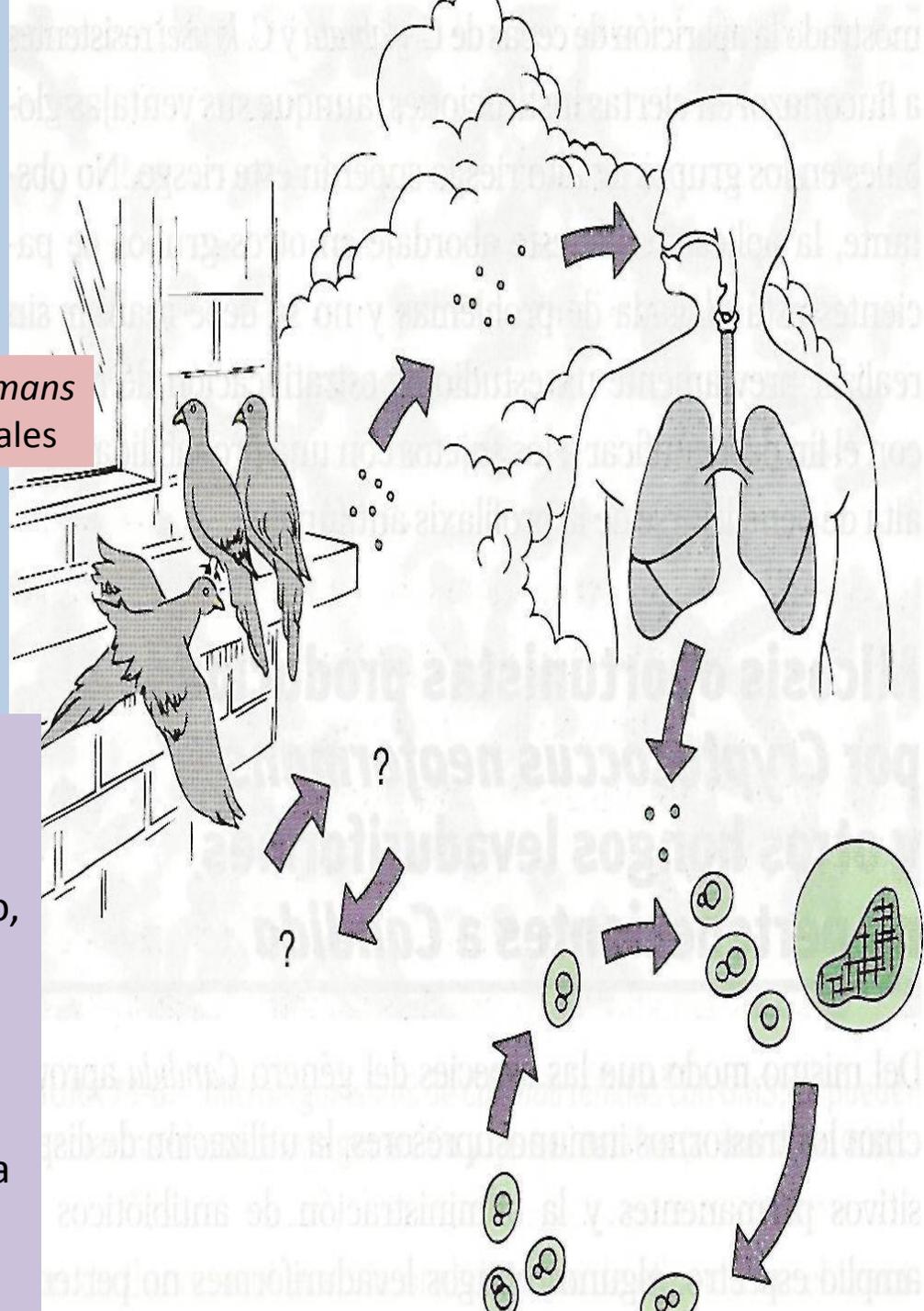
Patogenia

Criptococosis

se adquiere por inhalación de células de *C. neoformans* transportadas por el aire a partir de focos ambientales

diseminación desde los pulmones, al SNC produce una enfermedad clínica en los sujetos susceptibles.

- ❖ El marcado neurotropismo de *C. neoformans* también constituye un factor de virulencia, ya que se considera una forma de evadir las defensas del hospedero, lo cual está relacionado con la melanogénesis, sobre todo si se tiene en cuenta el alto contenido de catecolaminas en (SNC).
- ❖ La criptococosis cutánea primaria se debe a la inoculación transcutánea del patógeno, aunque es poco frecuente.



Salvo raras excepciones, la puerta de entrada de *Cryptococcus* son los pulmones.

La infección pulmonar primaria puede permanecer localizada o diseminarse a otros órganos en dependencia del estado inmune del hospedero

En individuos con un sistema de defensa íntegro, la infección que sigue a la inhalación se resuelve rápidamente con mínima sintomatología, por lo que la mayoría de estas infecciones pulmonares no se diagnostican.

En pacientes con compromiso en los mecanismos de defensa específicos, particularmente factores o patologías que afectan la respuesta inmune mediada por células, la enfermedad se extiende con rapidez y afecta casi todos los órganos, en especial el SNC.

Las principales condiciones predisponentes asociadas a la criptococosis son:

❑ trasplantes de órganos, tratamientos prolongados con esteroides, leucemias crónicas, enfermedad de Hodgkin, sarcoidosis y SIDA

Formas clínicas de la criptococosis

1. Meningitis

- Forma clínica más común de presentación
- Comienzo insidioso, subagudo y en ocasiones crónico
- Los síntomas más frecuentes son la fiebre y la cefalea. Esta última, durante meses, puede ser la única manifestación; por lo general es frontal, retroorbitaria o temporal y se inicia en forma insidiosa hasta hacerse continua y progresiva.
- Otros síntomas pueden ser: fotofobia, trastornos mentales, náuseas, vómitos y malestar general.
- El LCR suele ser claro, con presión elevada, aumento en el número de células (comúnmente $< 800/\text{mL}$) a predominio de linfocitos y baja concentración de glucosa. En los pacientes con SIDA, el estudio citoquímico del LCR puede ser normal.

2. Meningoencefalitis

- Forma poco común de infección fulminante y muerte en breve plazo, que resulta de la diseminación de la infección meníngea al parénquima cerebral.
- Los síntomas clínicos comprenden obnubilación, trastornos de memoria, confusión, irritabilidad, cambios de personalidad y psicosis. Las manifestaciones oculomotoras incluyen fotofobia, oftalmoplejía y nistagmo.
- Puede confundirse con el criptococoma si se presentan signos focales tales como hemiparesia o hemiplejía. La aparición de meningoencefalitis puede prevenirse con un diagnóstico rápido y un tratamiento oportuno.

3. Criptococoma

- Forma menos frecuente de presentación de la criptococosis del SNC.
- Sintomatología se caracteriza por cefalea, trastornos mentales (confusión, letargia y coma), náuseas, vómitos y trastornos visuales.
- La localización ocurre, principalmente, en los hemisferios cerebrales, con menos frecuencia en médula espinal y sólo rara vez en el cerebelo.
- Su tamaño es variable, desde unos pocos milímetros hasta 6 cm y con frecuencia se presenta como lesiones múltiples.

4. Pulmonar

- La infección pulmonar sintomática se manifiesta con tos, expectoración mucosa, malestar general, dolor pleural, pérdida de peso y fiebre.
- En algunos casos puede confundirse con la tuberculosis.
- Las imágenes radiológicas son inespecíficas y consisten en infiltrados localizados, no muy extensos en lóbulos inferiores, aunque también puede presentarse un nódulo pulmonar solitario.

5. Diseminada.

Además de la diseminación al SNC, a partir del foco pulmonar, la criptococosis puede diseminarse a otros órganos: hígado, riñón, bazo, ganglios linfáticos, suprarrenales, próstata, entre otros. En pacientes inmunodeprimidos, es común la criptococemia. La diseminación ósea es poco frecuente, aunque fue una de las primeras formas conocidas de criptococosis; las lesiones líticas se localizan, sobre todo, en el cráneo, costillas, pelvis y epífisis de huesos largos y vértebras.

6. Cutánea.

Puede presentarse en el curso de la diseminación o como formas cutáneas primarias. Generalmente se manifiesta en forma de pápulas, nódulos subcutáneos y ulceraciones.



MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN

Cryptococcus neoformans crece en la mayoría de los medios de cultivo empleados en el laboratorio de micología.

- ❑ En agar Sabouraud o en agar extracto de malta, las colonias se desarrollan en 36-72 hs a 25-30 °C o a 37 °C.
- ❑ Estas colonias son de color blanco amarillento a crema, y se tornan más oscuras al envejecer.
- ❑ Su aspecto es mucoso, poco elevadas, brillantes, de bordes enteros y húmedas.

Microscópicamente

- ✓ es un microorganismo levaduriforme encapsulado de forma esférica a ovalada y un diámetro comprendido entre 2-20 μm .
- ✓ se replica por gemación a partir de una base relativamente estrecha hasta alcanzar su mismo tamaño
- ✓ Por lo general se forman yemas solitarias, aunque en algunas ocasiones existen yemas múltiples y cadenas de células en gemación (figura 75-7).
- ✓ El material clínico suele carecer de tubos germinales, hifas y pseudohifas.

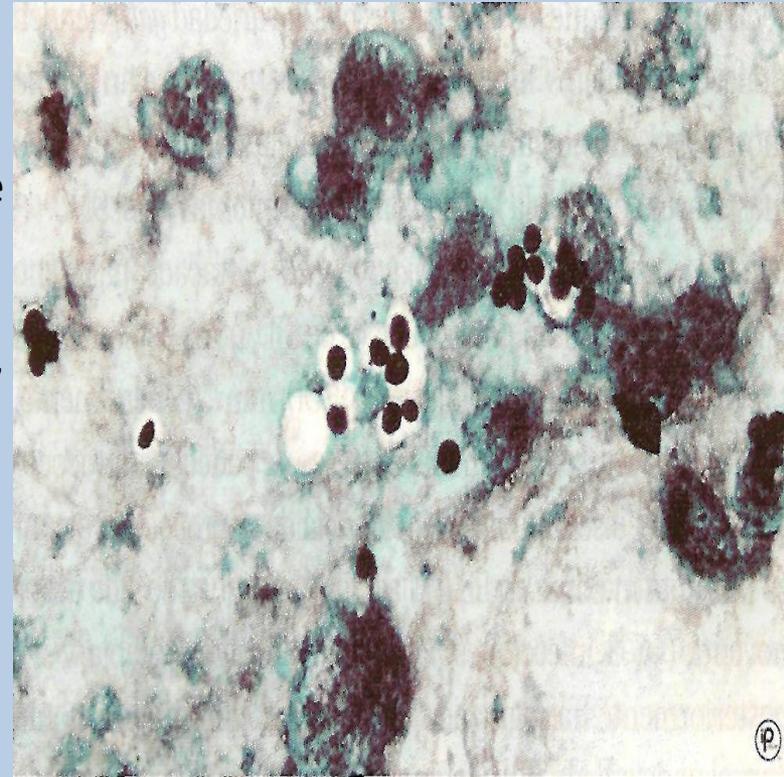


FIGURA 75-7. *Cryptococcus neoformans*, morfología microscópica

✓ La forma de las células es variable en los tejidos teñidos

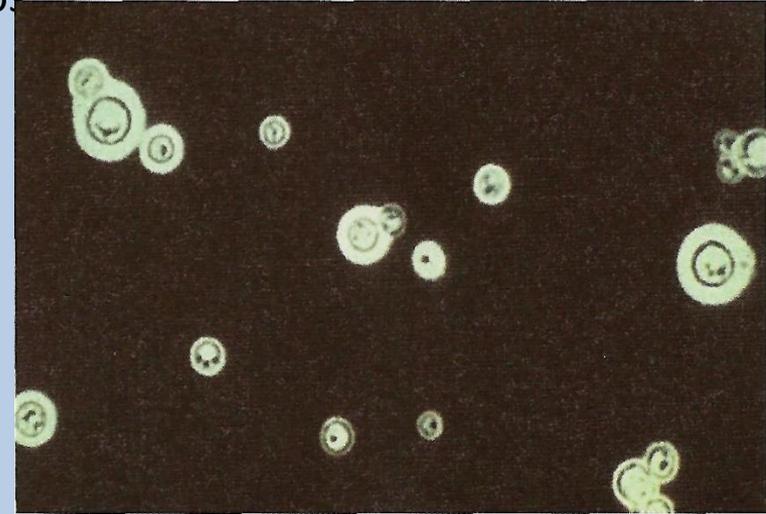
Con tinta china:

esférica, ovalada o elíptica; suelen rodearse de zonas esféricas o «halos» de contorno liso y fácil visualización que representan la cápsula polisacáridica extracelular .

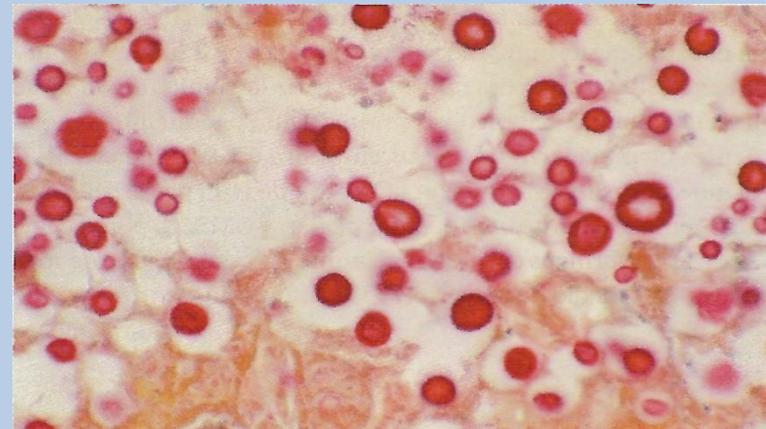
✓ La cápsula es un marcador inconfundible cuyo diámetro puede ser hasta cinco veces mayor que el de la célula micótica, se detecta con facilidad mediante una tinción de mucina como la técnica de mucicarmina de Mayer.

✓ El microorganismo se tiñe débilmente con la tinción de H-E, pero se detecta fácilmente mediante las tinciones de PAS (ácido periódico de Schiff) y GMS (plata metenamina de Grocott).

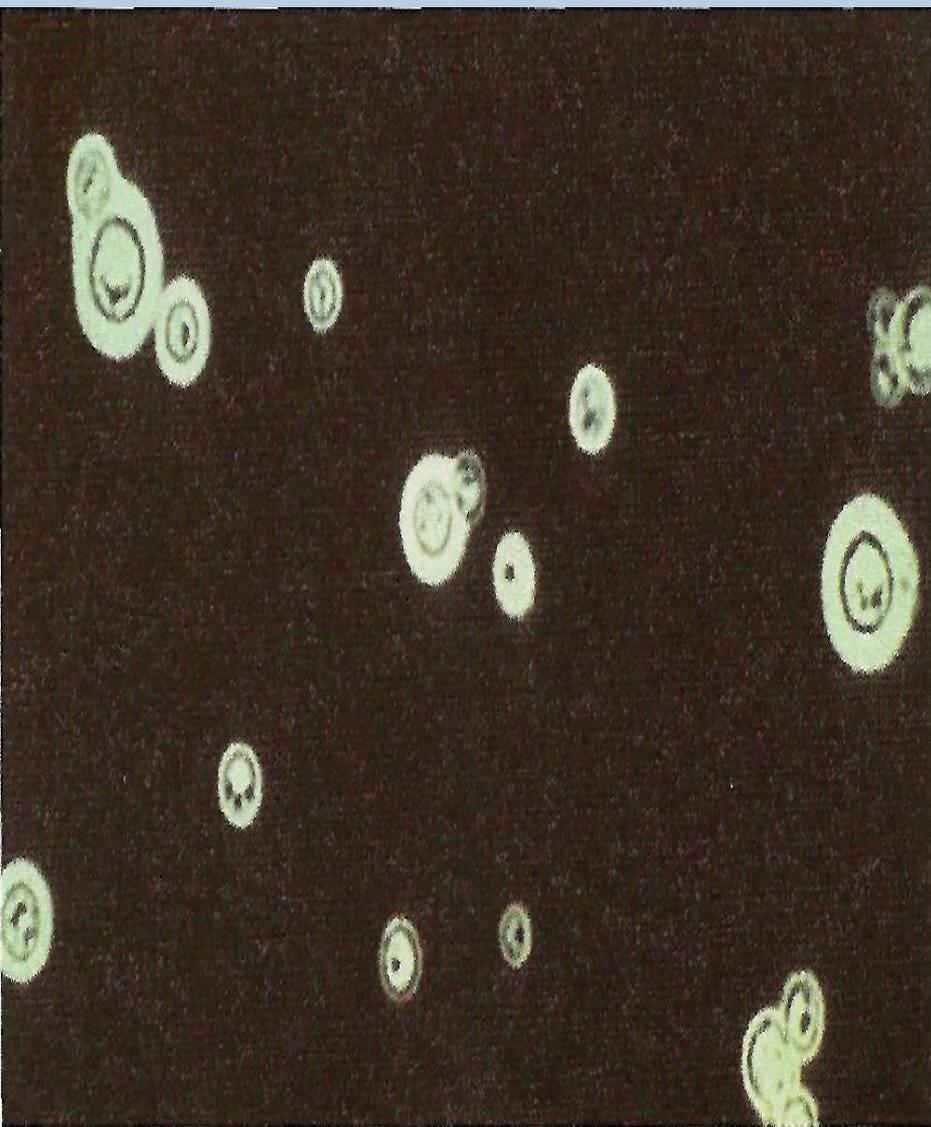
✓ La pared celular de *C. neoformans* contiene melanina, la cual se pone de manifiesto por medio de la tinción de Fontana-Masson.



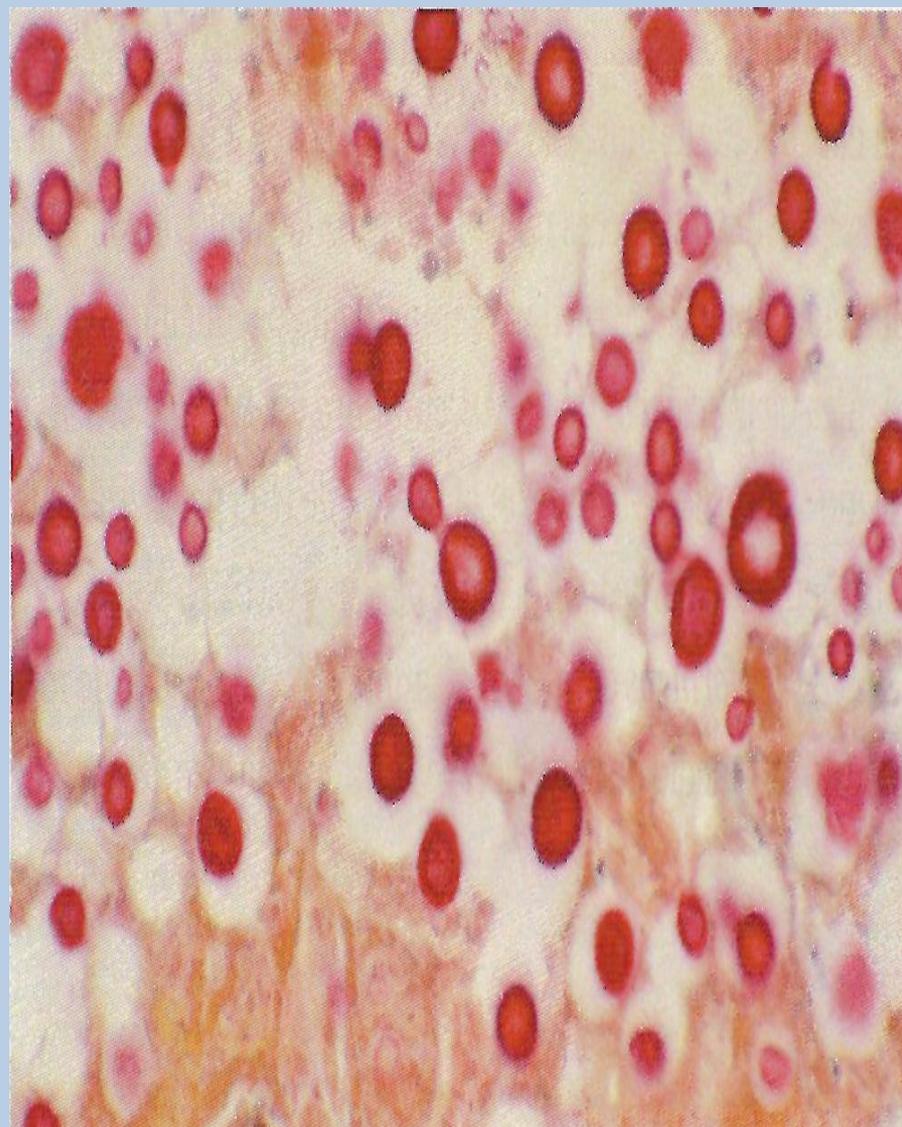
Preparación de *Cryptococcus neoformans* en tinta china que revela la llamativa cápsula que circunda a las levaduras de gemación



Tinción de *Cryptococcus neoformans* con mucicarmina



Preparación de *Cryptococcus neoformans* en tinta china que revela la llamativa cápsula que circunda a las levaduras de gemación



Tinción de *Cryptococcus neoformans* con mucicarmina

La formación de la cápsula puede ser estimulada *in vitro* mediante la siembra en Ag Ch a 37°C en atmósfera de CO₂

mientras que, en pases sucesivos en medios de cultivo como Ag Sabouraud o Ag extracto de malta, el tamaño de la cápsula tiende a disminuir.

Entre las **características fisiológicas** de *C. neoformans* se encuentran:

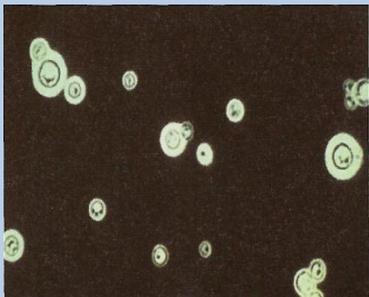
- ❖ No fermenta los carbohidratos
- ❖ Asimilación de inositol
- ❖ Producción de ureasa: esta enzimas actúa sobre la urea con la consiguiente alcalinización del medio
- ❖ Producción de fenoloxidasa: esta enzima es capaz de oxidar una variada gama de sustratos difenólicos hasta convertirlos en melanina.

Diagnóstico de laboratorio

Productos patológicos

- ✓ **LCR:** es la muestra clínica más útil para el diagnóstico
- ✓ Otras en dependencia de las manifestaciones clínicas, son: sangre, suero, esputo, lavado bronquioalveolar, aspirado de lesiones cutáneas, orina y biopsias.

Examen directo



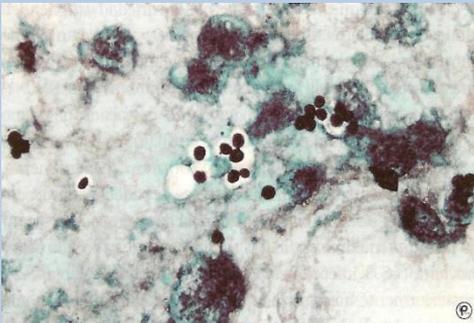
- ✓ Se realiza mezclando una gota de tinta china o nigrosina con sedimento de LCR, orina, lavado bronquioalveolar o con material de biopsia macerado
- ✓ Permite la observación de las levaduras encapsuladas por contraste negativo.
- ✓ La presencia de células gemantes es útil para evitar falsos diagnósticos por confusión con leucocitos u otros elementos formes. Esta técnica tiene una sensibilidad del 50 al 70 %, aunque sobrepasa el 90 % en pacientes con SIDA.

Las células de *C. neoformans* se visualizan mediante la:

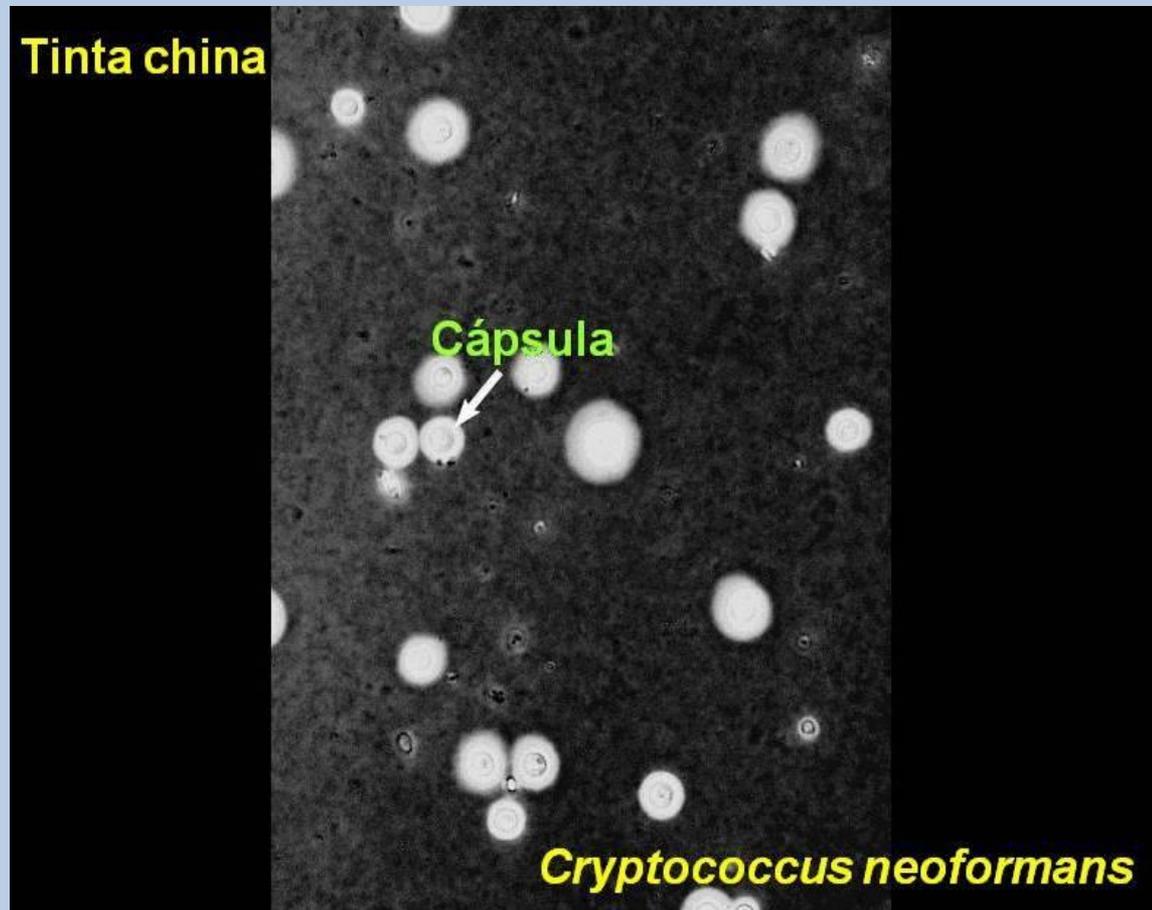
Tinción de Gram



Otras técnicas



Tinta china



Cultivo

- ✓ La muestra se inocular en placas de Agar-sangre o agar Sabouraud con cloranfenicol o sin este (no debe añadirse cicloheximida, ya que inhibe su crecimiento).
- ✓ Incubar a 30 °C/48 a 72 horas como mínimo, aunque no se deben descartar como negativos hasta pasadas, al menos, 3 semanas
- ✓ Hemocultivos

Ponen de manifiesto la presencia de las levaduras de gemación encapsuladas características de este microorganismo.

Cultivo

colonias mucoides formadas por levaduras de gemación encapsuladas redondeadas ureasa-positivas tras un período de incubación de 3 a 5 días.

Identificación de *Cryptococcus neoformans*.

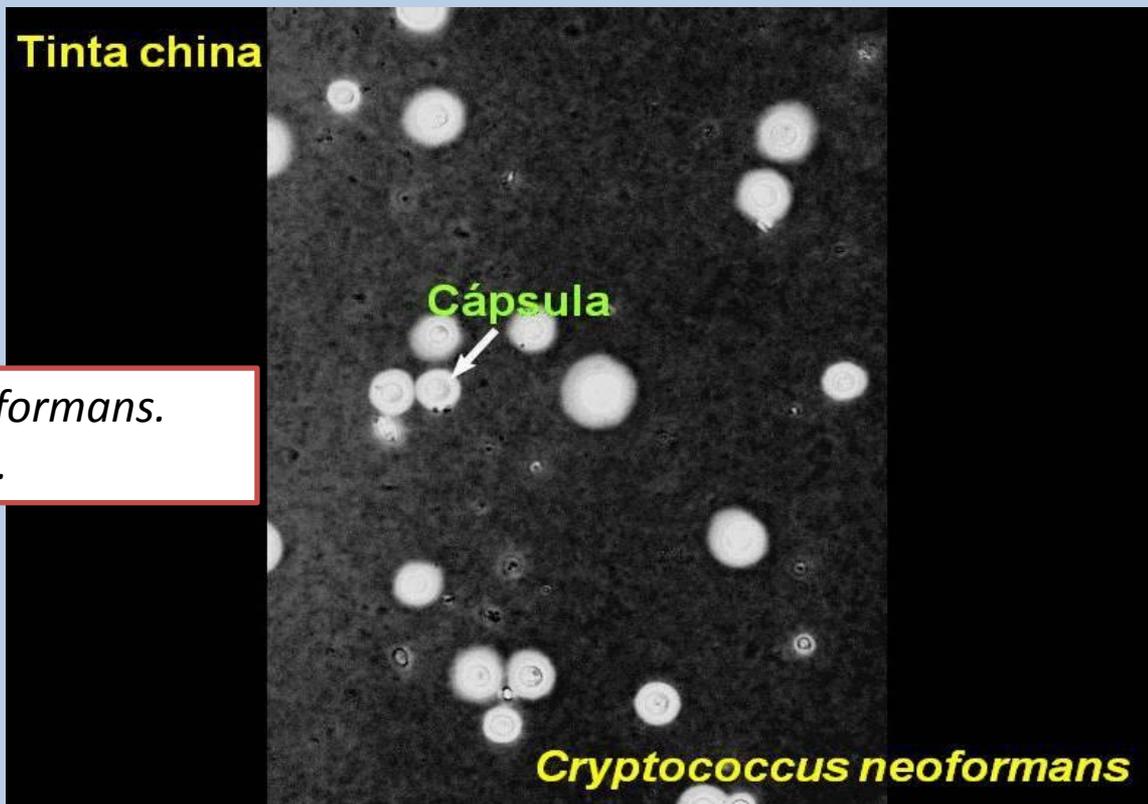
- Morfología de las colonias
- Son mucoides y brillantes.
- Sobre el ASD desarrollan un color blanco amarillento, son poco elevadas y de bordes continuos
- Agar *niger seed* (agar semilla de girasol) desarrollan un color marrón.



Examen microscópico

Levaduras redondas de 7 a 15 μm de diámetro, en algunos casos pueden producir blastoconidias. Su principal característica es la de presentar una cápsula que la circunda, visible al examen directo con la tinta china.

Control positivo: *Cryptococcus neoformans*.
Control negativo: *Candida albicans*.



Producción de ureasa

Se basa en la capacidad de producir la enzima ureasa, la cual desdobla la urea en dióxido de carbono y amonio, incrementando el pH del medio y produciendo un cambio de color rojo – púrpura en el indicador rojo de fenol.

Procedimiento

- Se utiliza el medio de Christensen, en el cual se inocula una asada de la levadura en estudio.

Los medios se incuban a 37 °C / 6 h o a temperatura ambiente/3 días.

Interpretación

La prueba se considera positiva cuando se alcaliniza el medio lo que produce un cambio de color original (amarillo) a rosa o rojo.



Urea (+)

Urea (-)

Positivo: *Cryptococcus neoformans*.

Negativo: *Candida albicans*

Prueba de la fenoloxidasa

Capacidad de *C. neoformans* de formar un pigmento marrón o negro, denominado melanina, a partir de compuestos difenólicos.

La producción de este pigmento mediante la prueba de la L – dopa – citrato férrico, es realizada por la enzima fenoloxidasa.

Procedimiento

- Inocular una a dos colonias de la levadura en estudio, sobre la superficie de cada cuadrado de papel Whatman N.º 1.
- Incubar en cámara húmeda a 28 °C de 3 a 18 h.

Interpretación

La reacción positiva se evidencia con la producción de un pigmento marrón oscuro o negro alrededor de la colonia de *C. neoformans*.

Positivo: *Cryptococcus neoformans*.

Negativo: *Candida albicans*.

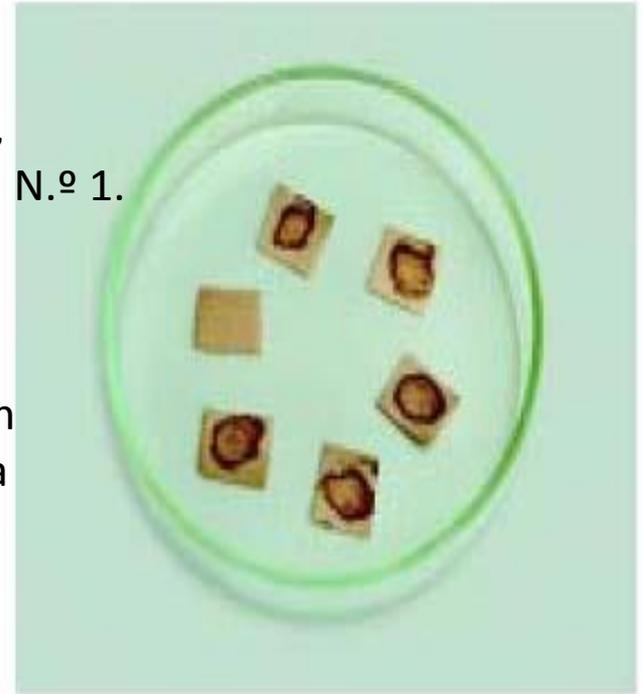


Figura 2. Manchas de pigmentación oscuro a negro de 5 cepas de C. neoformans para la prueba de la fenoloxidasa a 28° C en medio ASD al 0,1%. A la izquierda, el control negativo (Candida).

Pruebas serológicas

- ❑ La detección del antígeno criptocócico: el polisacárido capsular en el LCR y otros fluidos corporales (suero, orina y lavados bronquioalveolares) mediante la prueba de aglutinación de látex, constituye una herramienta de alta sensibilidad y especificidad que permite el diagnóstico rápido de la criptococosis. También se ha empleado la técnica de ELISA.
- ❑ Estas pruebas son rápidas, sensibles y específicas para el diagnóstico de la enfermedad criptocócica
- ❑ La detección de anticuerpos no tiene valor diagnóstico, aunque su presencia suele reconocerse como signo de buen pronóstico. Las técnicas más utilizadas para su detección son la inmunofluorescencia indirecta y la aglutinación en tubo.

TABLA 71-4. Marcadores antigénicos, bioquímicos y moleculares para la detección directa de las micosis invasivas

Microorganismo	Componentes de la pared celular o cápsula	Antígenos citoplásmicos	Metabolitos	Secuencias de ADN genómico ^a
<i>Candida</i>	Mananos LA RIA EIA P-(1,3)-glucanos Prueba de uso de amebocitos de <i>Limulus</i> Quitina Espectrofotometría	Enolasa EIA Inmunotransferencia Anticuerpo anti-enolasa EIA Producto de 47 kDa procedente de la degradación de HSP-90 Enzimoimmunoanálisis o prueba de inmunováloration	D-arabinitol GLC/FID enzimático rápido Espectroscopia de masas/GLC	Gen de actina Gen de quitina-sintetasa Gen P450 ITS Genes de ARN ribosomal
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Polisacárido capsular LA EIA		D-manitol Espectroscopia de masas GLC	Genes de ARN ribosomal ITS GenURA5
<i>Aspergillus</i>	Galactomanano LA EIA RIA P-(1,3)-glucanos Prueba de lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> Quitina Espectrofotometría		D-manitol GLC/FID Espectroscopia de masas/GLC	Gen P450 Genes de ARN ribosomal ITS Gen de proteasa alcalina Genes mitocondriales
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Pared celular RIA para proteína de adhesión de pared celular de 120 kDa			Genes de ARN ribosomal ITS
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Pared celular RIA y EIA para antígeno polisacárido			Genes de ARN ribosomal ITS
<i>Penicillium marneffei</i>	Manoproteína de pared celular EIA			ITS

Tratamiento

La meningitis criptocócica y otras formas diseminadas de la criptococosis son siempre mortales en ausencia de tratamiento.

- Anfotericina B con flucitosina de forma aguda durante 2 semanas (tto de inducción) seguidas de un tto de consolidación con fluconazol oral (preferiblemente) o itraconazol a lo largo de 8 semanas.
- Los pacientes de SIDA suelen precisar de un tratamiento de mantenimiento de por vida con fluconazol o itraconazol.
- Es preciso llevar a cabo un seguimiento clínico y micológico de estos pacientes. El seguimiento micológico se realiza mediante punciones lumbares repetidas.

Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum

Por razones de brevedad, se le suele denominar simplemente

Histoplasma capsulatum

hongo dimórfico, que habita en suelos enriquecidos con excretas de aves y murciélagos, en regiones de todos los continentes.



Su fase sexual o estado teleomorfo se ha denominado ***Ajellomyces capsulatus***.

PATOGENIA Y DATOS CLÍNICOS

La infección por *H. capsulatum* es el resultado de:

la inhalación de microconidios de la fase filamentosa.

La cuantía crítica del inóculo no ha podido ser precisada y depende en gran medida del estado inmunitario del hospedero.

Entre los 3-5 días después de la inhalación

los microconidios germinan

dan lugar al desarrollo de la fase levaduriforme en el parénquima pulmonar

Los microconidios inhalados inducen una respuesta de neutrófilos en 24 horas, los cuales son responsables de la respuesta primaria no inmune en los pulmones.

Los neutrófilos pueden ser fungicidas frente a los microconidios

pero no frente a las levaduras de *H. capsulatum*.



Los macrófagos se acumulan rápidamente y fagocitan a dichas levaduras y es ahí donde estas proliferan.

En el hospedero inmunodeprimido se produce un acúmulo excesivo de microorganismos intracelulares,



produce un bloqueo de los macrófagos y un retardo del desarrollo de la inmunidad específica del hospedero.

Los macrófagos parasitados transportan el hongo hacia los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado y otros órganos del sistema reticuloendotelial, dando como resultado una diseminación.

En pacientes con **alteraciones de la respuesta inmune celular**, la infección por *H. capsulatum* no suele ser controlada



hay tendencia a la diseminación progresiva.



La infección se extiende a varios órganos: médula ósea, hígado, bazo y glándulas suprarrenales.



Esta diseminación progresiva de la histoplasmosis se desarrolla en un corto período después de la exposición, en ocasiones puede demorar 2 o + años, en dependencia del estado inmunitario del paciente.

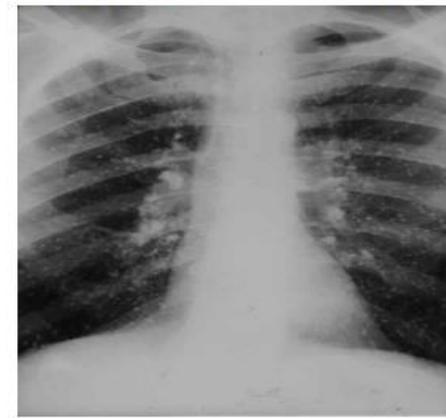
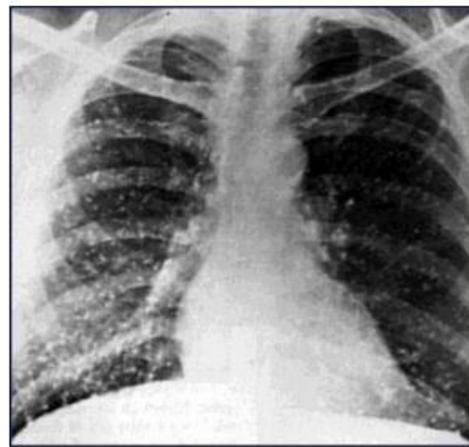
Los pacientes infectados con VIH, con una profunda deficiencia de la función de los linfocitos T, pueden desarrollar un síndrome similar a una septicemia con *shock*, distrés respiratorio y coagulación intravascular diseminada.

- ❑ La gran mayoría de las infecciones por *H. capsulatum* cursan de forma asintomática (90-95 %) y se manifiestan por la respuesta a la prueba intradérmica de histoplasmina y, en algunos casos, por la presencia de focos pulmonares de calcificación en la imagen radiológica.
- ❑ Sin embargo, entre el 5-10% de los infectados presentan una sintomatología muy variable que depende, del número de conidios inhalados y del estado inmunitario del hospedero.

Formas clínicas de la histoplasmosis

Las más frecuentes son:

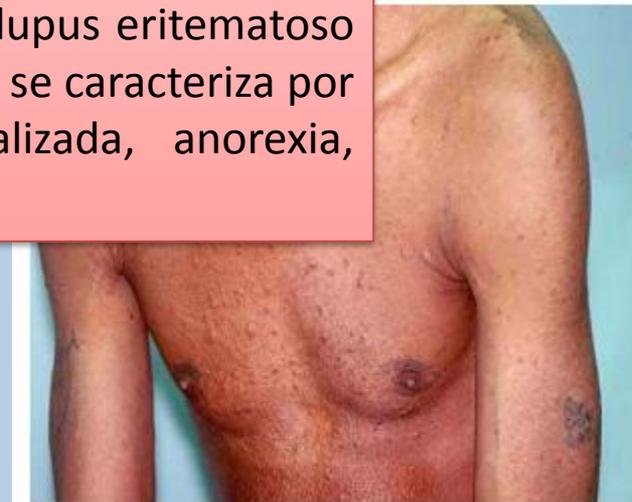
1. Pulmonar aguda.



- ✓ La forma leve es una enfermedad respiratoria, clínicamente indistinguible de un resfriado común o un estado gripal.
- ✓ Los síntomas más frecuentes son inespecíficos: fiebre, malestar, cefalea, mialgia, anorexia, tos no productiva y dolor torácico.
- ✓ Comienzo súbito; hay agrandamiento hilar y del mediastino. Se puede presentar eritema nudoso y multiforme. La radiografía de tórax a veces muestra la presencia de un infiltrado local con linfadenopatía que posteriormente puede calcificarse.
- ✓ Los síntomas es posible que desaparezcan espontáneamente antes de las 3 semanas.
- ✓ En algunos casos la enfermedad toma una forma más severa y hace necesaria la terapia antimicótica.

2. Progresiva diseminada.

- ✓ Afecta a niños y a personas de edad avanzada, causando una enfermedad casi siempre mortal.
- ✓ En los pacientes con VIH generalmente adopta una forma caracterizada por la afección a varios órganos y sistemas, con una elevada frecuencia de lesiones cutáneas y de la mucosa oral, una baja positividad en los métodos de diagnóstico serológico y una relativamente alta proporción de medulocultivos y hemocultivos positivos.
- ✓ También se ha observado en otros pacientes inmunodeprimidos o con algún trastorno predisponente como son: los tratamientos con esteroides, trasplantes de órganos, linfomas, leucemias, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, pancitopenia, etc. El cuadro se caracteriza por hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, anorexia, pérdida de peso y fiebre



3. Pulmonar crónica.

- ✓ Esta es una forma clínica que se desarrolla en el adulto, varón, entre la tercera y la cuarta décadas de la vida, residente en áreas endémicas.
- ✓ Constituyen factores predisponentes: hábito de fumar y los defectos anatómicos preexistentes.
- ✓ Más del 90 % de los pacientes dan resultados positivos en las pruebas serológicas que detectan anticuerpos específicos.
- ✓ Los síntomas iniciales son: tos productiva, posibles hemoptisis, disnea y eventualmente otros signos de enfermedad respiratoria crónica (pérdida de peso, inanición, cianosis).

4. Cutánea primaria.

- ✓ Es una enfermedad que se presenta con muy baja frecuencia (0,5 %).
- ✓ No hay compromiso pulmonar y rara vez se disemina a otro órgano.
- ✓ Se produce por la entrada de partículas contaminadas con material infectante a través de heridas o traumatismos en piel, lo cual puede ocurrir en actividades agrícolas o trabajos de laboratorio.
- ✓ Se desarrolla una úlcera indolora, chancriforme, con adenitis regional.
- ✓ Las lesiones pueden involucionar hasta resolver de forma espontánea a los pocos meses, aunque en otros casos pueden progresar crónicamente con compromiso de los linfáticos de drenaje.



Entrada del hongo por traumatismos cutáneos. Más frecuente en los recolectores de guano y personas que limpian gallineros

5. Histoplasmosis.

- ✓ Constituyen masas fibrosas que se desarrollan alrededor de un foco curado de infección primaria pulmonar.
- ✓ Su diagnóstico muchas veces es casual, sobre la base de una radiografía de tórax, donde se puede apreciar una lesión cavitaria, calcificada, con un foco central necrótico que al encapsularse forma una masa rígida y fibrosa.
- ✓ Es importante realizar el diagnóstico diferencial con el tuberculoma, el coccidioidoma y las neoplasias. En ocasiones puede ocurrir una diseminación a otros órganos, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos.
- ✓ Algunas veces estas lesiones continúan creciendo cerca de sitios vitales y pueden originar complicaciones, aunque la mayor parte de los histoplasmosas dejan de crecer y se calcifican. En algunos casos se requiere intervención quirúrgica

EPIDEMIOLOGÍA Y CONTROL

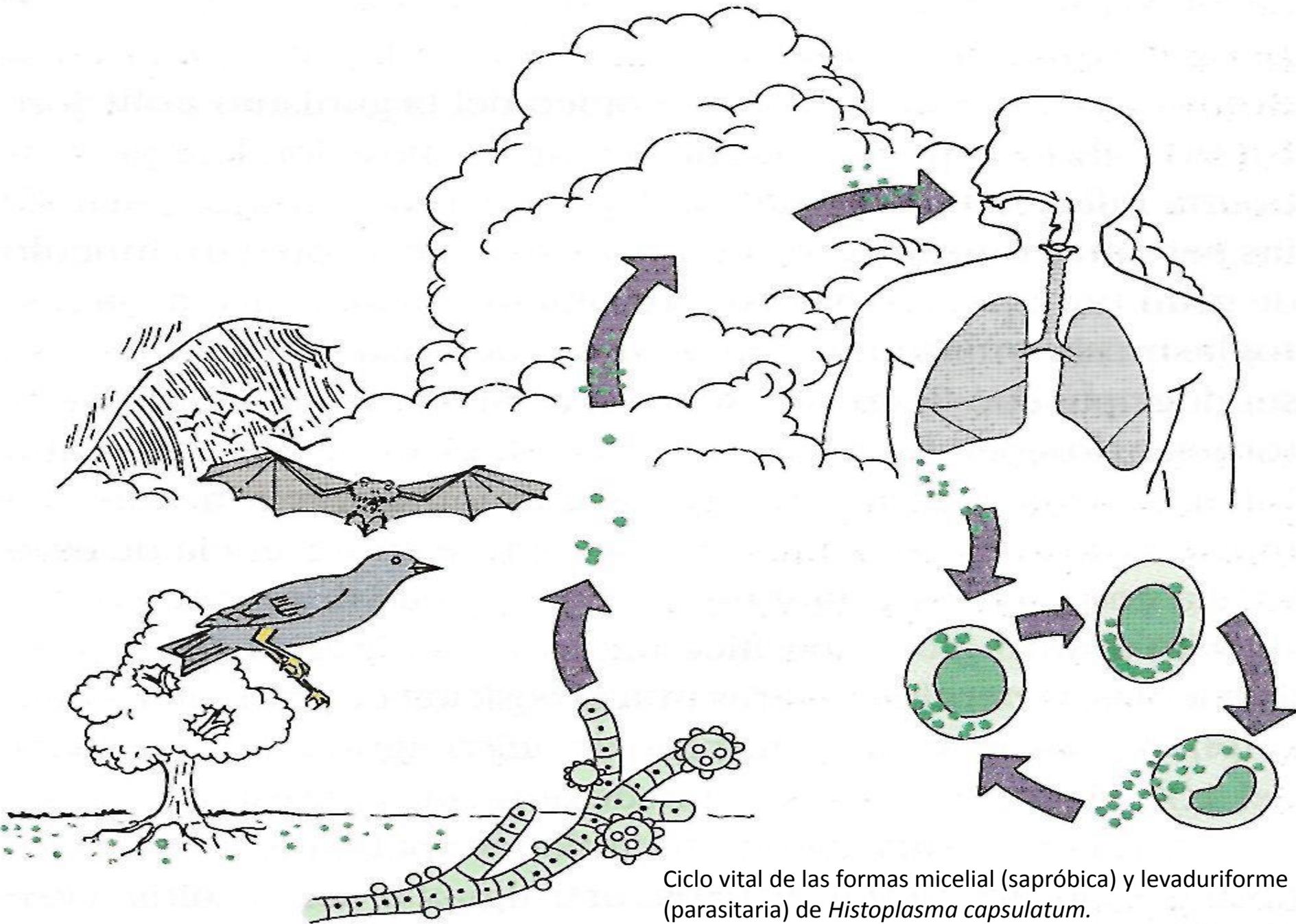
- ✓ *Histoplasma capsulatum* crece en suelos con alto contenido de nitrógeno y fosfato
- ✓ Se ha encontrado en los cinco continentes.
- ✓ Durante la niñez, ambos sexos son igualmente susceptibles, pero adultos se presenta más en el hombre que en la mujer. Se ha señalado como causa de este hecho la mayor exposición del hombre a posibles fuentes de infección; y se ha comprobado el efecto inhibitorio de los estrógenos sobre el crecimiento de *H. capsulatum*.
- ✓ Una exposición muy constante a cantidades abundantes de conidios en ambientes cerrados puede resultar letal

Hábitat: Suelos enriquecidos con excretas de murciélagos y aves



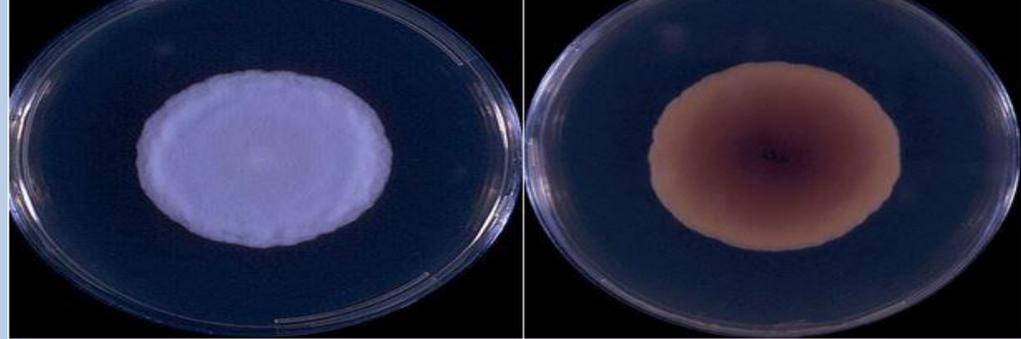
Brotos asociados con:

- Limpieza de locales abandonados
- Exploración de cuevas
- Limpieza de gallineros, palomares
- Tala de árboles
- Maniobras militares
- Minería



Ciclo vital de las formas micelial (sapróbica) y levaduriforme (parasitaria) de *Histoplasma capsulatum*.

MORFOLOGÍA E IDENTIFICACIÓN



Culture of *Histoplasma capsulatum* on Sabouraud's dextrose agar showing a white suede-like colony with a pale yellow-brown reverse.

A temperaturas inferiores a 35 °C, *H. capsulatum* crece formando colonias con un micelio blanco algodonoso con abundantes hifas aéreas.

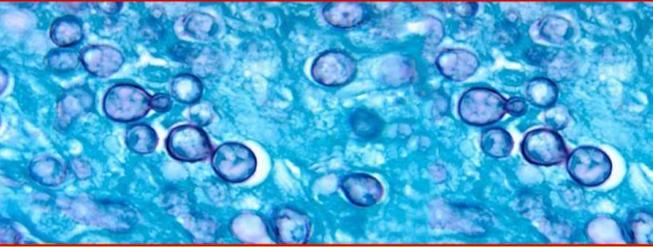
al microscopio se observan macroconidios tuberculados, esféricos, de pared gruesa, que miden de 8 a 14 μm de diámetro y microconidios lisos o ligeramente rugosos de 2 a 4 μm de diámetro; no produce pigmentos difusibles en el medio de cultivo.

Pueden presentarse, también, colonias de color pardo con un micelio aéreo escaso, aplanado, de color canela a pardo oscuro con hifas tenuemente pigmentadas, estrechas, y gran número de macroconidios tuberculados.

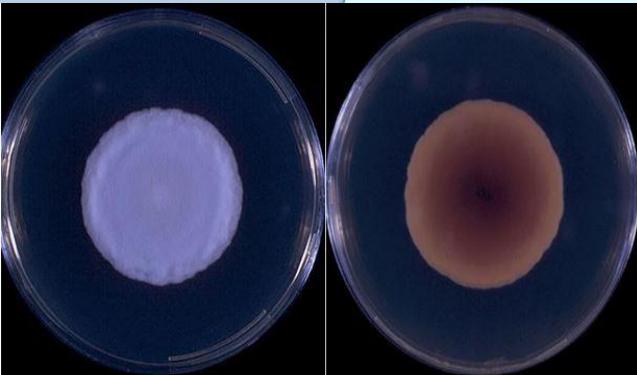
La macromorfología colonial de *H. capsulatum* resulta difícil de diferenciar de la de algunos hongos contaminantes e, incluso, de algunos patógenos, se hace imprescindible observar la presencia de los macroconidios tuberculados y demostrar su dimorfismo.

Hongos saprófitos como *Chrysosporium* y *Sepedonium* también producen macroconidios muy semejantes a los de *H. capsulatum*, aunque a diferencia de este, no crecen a 37 °C.

Histoplasma capsulatum



En estado parasitario y en medios de cultivo enriquecidos, a 37 °C, se observan células levaduriformes esféricas u ovaladas, de 2 a 3 por 3 a 4 μm , de paredes finas, que se reproducen por gemación polar con una base estrecha.



Culture of *Histoplasma capsulatum* on Sabouraud's dextrose agar showing a white suede-like colony with a pale yellow-brown reverse.

En los medios de cultivo se desarrollan colonias cremosas de color grisáceo a beige.

el dimorfismo de *H. capsulatum* está determinado, fundamentalmente, por la temperatura y los nutrientes del medio.

La conversión de la fase filamentosa a la levaduriforme y viceversa es un proceso reversible y constituye un valioso criterio de identificación de *H. capsulatum*

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

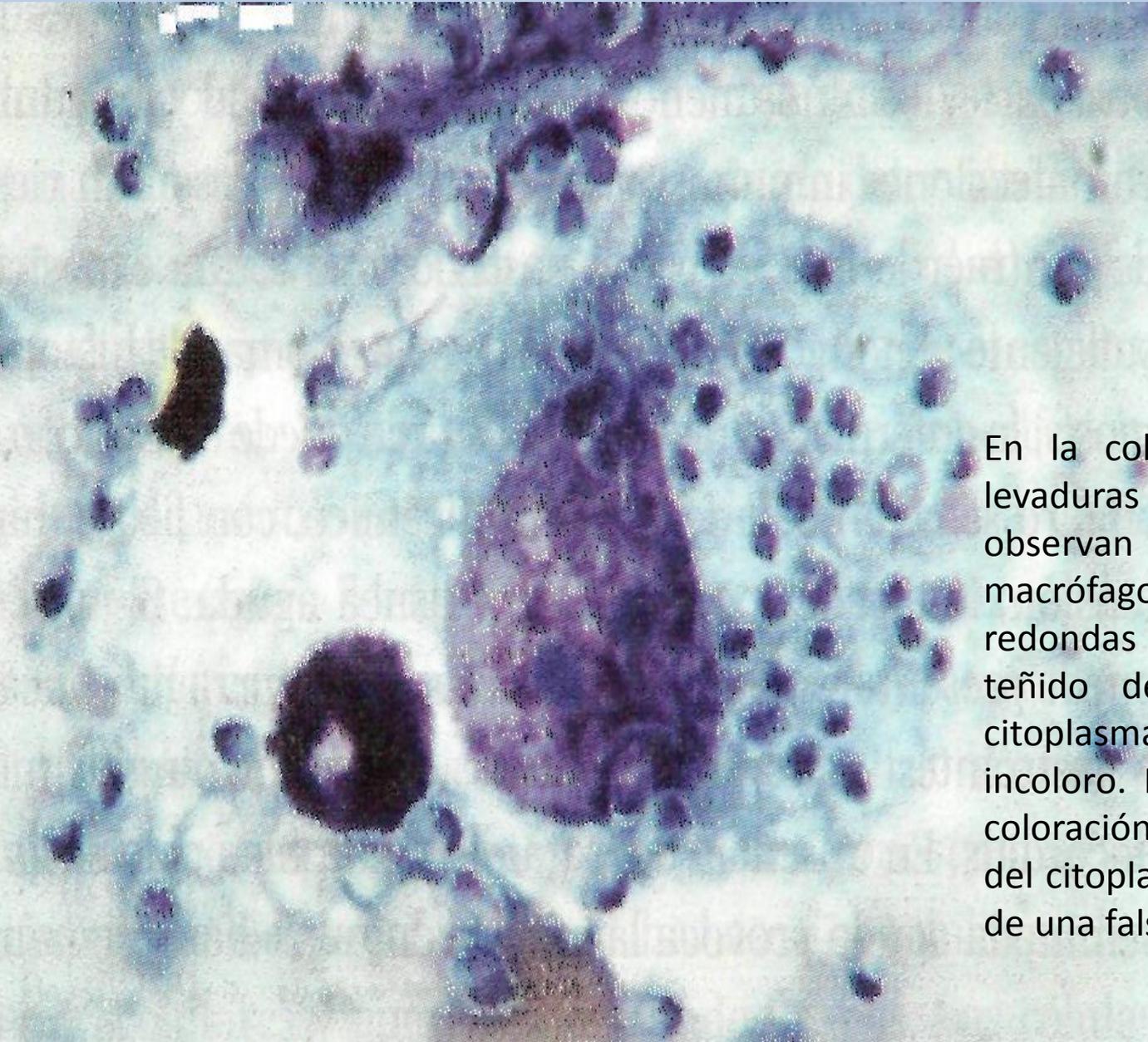
Productos patológicos

Más recomendados son: esputo y otras secreciones respiratorias, sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, exudados de piel y mucosas, biopsias (hígado, bazo, cerebro, ganglios, etc.), en dependencia del cuadro clínico.

Examen directo.

- ✓ El ex microscópico directo de las muestras, sin coloración previa, resulta de poco valor diagnóstico debido al pequeño tamaño de las levaduras.
- ✓ Los frotis coloreados con Giemsa o Wright son de gran ayuda en el diagnóstico de la histoplasmosis. Mediante la coloración de Giemsa las levaduras de *H. capsulatum* se observan dentro de los macrófagos, pequeñas (2 a 3 μm), redondas a ovoides, con el núcleo teñido de violeta oscuro y el citoplasma en azul tenue, casi incoloro. Por efectos de la propia coloración, ocurre una retracción del citoplasma dando la apariencia de una falsa cápsula.
- ✓ Se ha empleado el blanco de calcoflúor y para cortes histológicos de muestras de biopsias se recomiendan las coloraciones de PAS y metenamina de plata.

La observación, en cualquier tipo de muestra clínica, de levaduras intracelulares con las características mencionadas es altamente sugestiva de histoplasmosis.

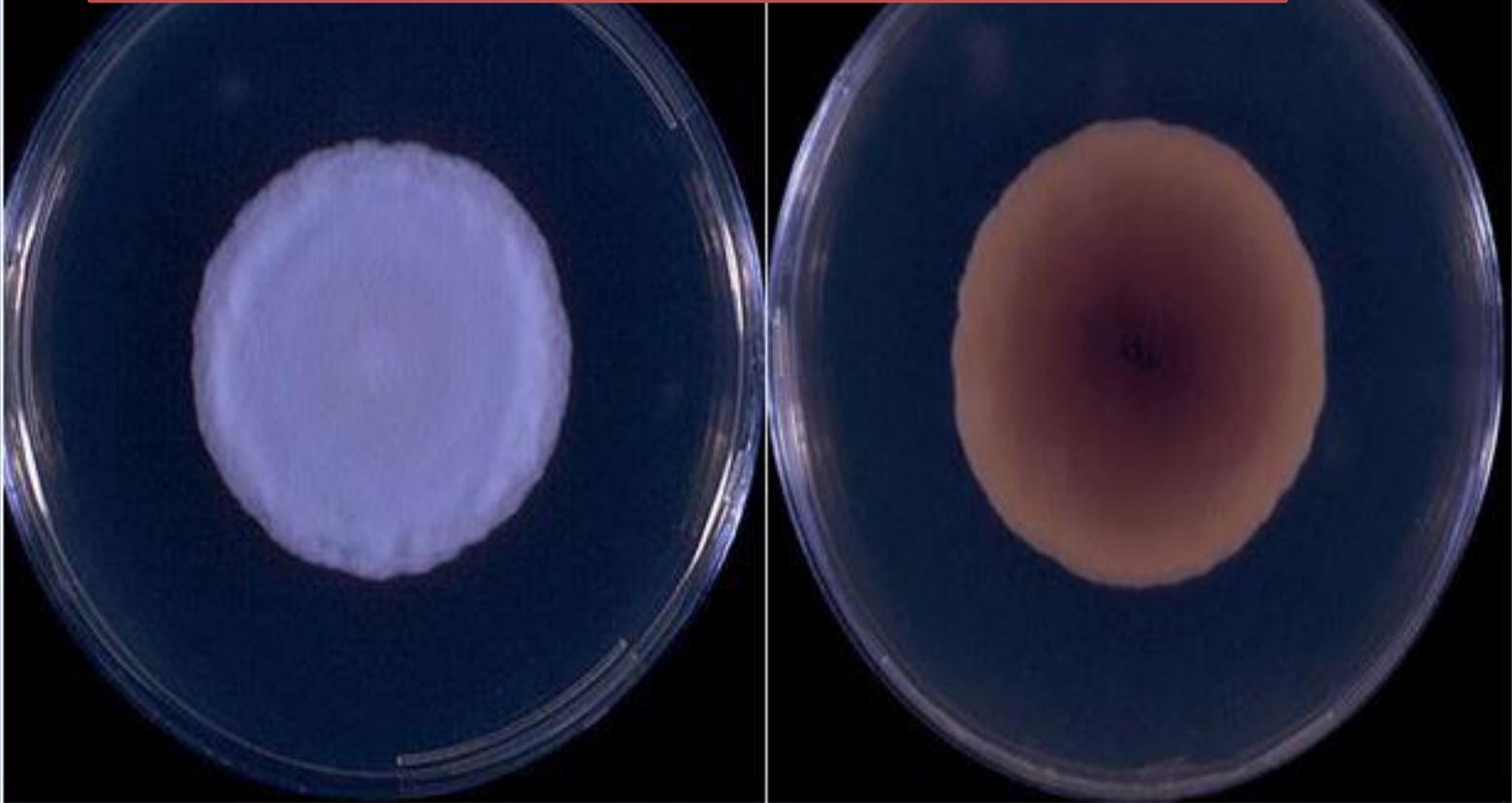


En la coloración de Giemsa las levaduras de *H. capsulatum* se observan dentro de los macrófagos, pequeñas (2 a 3 μm), redondas a ovoides, con el núcleo teñido de violeta oscuro y el citoplasma en azul tenue, casi incoloro. Por efectos de la propia coloración, ocurre una retracción del citoplasma dando la apariencia de una falsa cápsula.

Cultivo

- ❖ Siembra de muestras seriadas en medio agar Sabouraud y agar Sabouraud con cloranfenicol y cicloheximida, así como su incubación a 28 °C.
- ❖ El material patológico debe sembrarse paralelamente en medios de cultivo enriquecidos como son: agar-sangre con glucosa y cisteína, y agar infusión de cerebro y corazón con cisteína e incubar a 37 °C para lograr la fase levaduriforme.
- ❖ Otro medio de cultivo recomendado para el primoaislamiento de *H. capsulatum* es el agar extracto de levadura-fosfatos, con hidróxido de amonio.
- ❖ Tiempo de incubación de 2-4 semanas, aunque según la mayoría de los autores es recomendable esperar hasta 6 u 8 semanas; otros, en cambio, prefieren incubar hasta las 12 semanas antes de considerar una muestra negativa.

En los medios de cultivo se desarrollan colonias cremosas de color grisáceo a beige.



Culture of *Histoplasma capsulatum* on Sabouraud's dextrose agar showing a white suede-like colony with a pale yellow-brown reverse.

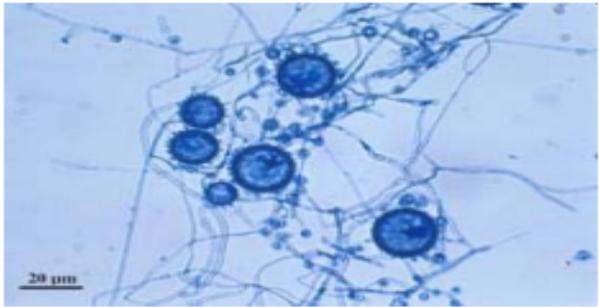
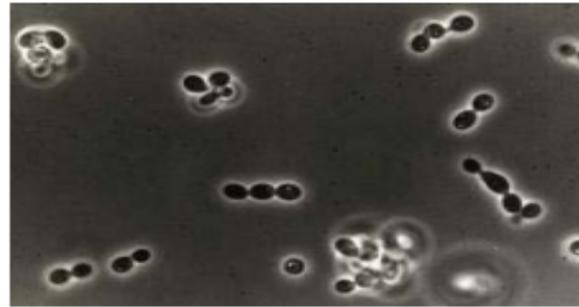
-Cultivo:

➤ **Fase filamentosa: Sabouraud y Sabouraud-cloranfenicol- cicloheximida a 28°C, 6-8 semanas.**

➤ **Fase levaduriforme: Agar-sangre con glucosa y cisteína, agar infusión de cerebro y corazón con cisteína a 37°C, 6-8 semanas.**

En estado parasitario y en medios de cultivos a 37°C: Células levaduriformes.

A temperaturas inferiores a 35°C: Macroconidios tuberculados (fase filamentosa).



La conversión de la fase filamentosa a la levaduriforme y viceversa, constituye un valioso criterio de diagnóstico.

Inoculación en animales.

La inoculación en animales de laboratorio (ratones, cobayos y cricetos son los más susceptibles) se realiza tanto para el aislamiento de *H. capsulatum* a partir de diferentes tipos de muestras de origen clínico o ambiental como para la conversión a la fase levaduriforme *in vivo*. Las muestras "contaminadas" (por ejemplo, esputo) son las que generalmente se someten a este proceso por las dificultades que presenta el aislamiento del patógeno mediante la siembra directa en medios de cultivo. Entre 2 y 4 semanas los animales se sacrifican y los hígados y bazo se maceran e inoculan en los medios de cultivo ya mencionados para su posterior identificación

Pruebas serológicas

El diagnóstico serológico de la histoplasmosis exige la realización de pruebas de detección de antígenos y anticuerpos (véase tabla 74-2).

Detección de anticuerpos

- fijación del complemento
- inmunodifusión.

Por lo general, estas pruebas se realizan de forma conjunta con el fin de maximizar la sensibilidad y la especificidad, aunque ninguna de ellas resulta útil en el marco agudo y ambas suelen arrojar resultados negativos en los pacientes inmunodeprimidos aquejados de una infección diseminada.

Detección del antígeno polisacarídico de *H. capsulatum* en muestras de suero, LCR, orina y lavados bronquioalveolares

- radioinmunoensayo
- ELISA.

- ❑ en suero y orina por medio del enzimoimmunoanálisis se ha convertido en una prueba de gran utilidad, en especial en el diagnóstico de la enfermedad diseminada.
- ❑ La sensibilidad de la detección antigénica es > en las muestras de orina que en las de sangre y abarca de un 21% en la enfermedad pulmonar crónica a un 92% en la forma diseminada.
- ❑ Desde los 1ros estadios de la enfermedad, este Ag puede ser detectado, de forma rápida y los resultados pueden ser expresados cualitativa y cuantitativamente.
- ❑ Estas pruebas no sustituyen a las convencionales (detección de Ac, examen directo y cultivo), sino que las complementan, pues mejoran la sensibilidad general del diagnóstico y aumentan su rapidez, particularmente en aquellos pacientes con las formas graves de la enfermedad
- ❑ Las determinaciones seriadas del Ag se pueden usar para valorar la respuesta al tto y confirmar la recidiva de la enfermedad.

- **Prueba cutánea (Histoplasmina)**

- Inoculación intradérmica de 0,1 ml de histoplasmina.
- La lectura se realiza a las 48-72 horas.
- Es positiva cuando la zona de induración tiene un diámetro mayor a 5mm.
- Es útil para delimitar áreas endémicas.



Su valor diagnóstico es limitado, pues no discrimina entre infección pasada y reciente.

Ha permitido delimitar las áreas endémicas.

En las formas graves de la histoplasmosis, la negativización de la intradermorreacción es índice de mal pronóstico.

TABLA 74-1. Características de las micosis por hongos dimórficos endémicos

Micosis	Etiología	Ecología	Distribución geográfica	Morfología en tejido	Manifestación clínica
Blastomicosis	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Materia orgánica en descomposición	Norteamérica (valles de los ríos Ohio y Misisipi), África	Levaduras de gemación de base ancha (8-15 μm de diámetro)	Enfermedad pulmonar (<50%); extrapulmonar: piel, hueso, genitourinaria, sistema nervioso central; enfermedad diseminada en pacientes inmunodeprimidos
Coccidioidomicosis	<i>Coccidioides immitis</i> <i>Coccidioides posadasii</i>	Suelo, polvo	Suroeste de EE.UU., México, Centro y Sudamérica	Esférulas (20-80 μm) que contienen endosporas (2-4 μm)	Infección pulmonar asintomática (80%) en anfitrión normal; infección pulmonar progresiva y diseminación (piel, hueso, articulaciones, meninges) en sujetos inmunodeprimidos
Histoplasmosis por <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	<i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Suelo con un elevado contenido en nitrógeno (excrementos de ave/murciélago)	Norteamérica (valles de los ríos Ohio y Misisipi), Centro y Sudamérica	Levaduras de gemación de base ancha, forma ovalada y pequeño tamaño (2-4 μm) (intracelulares)	Infección pulmonar asintomática (90%) en sujetos sanos y exposición de baja intensidad; enfermedad diseminada en inmunodeprimidos y niños
Histoplasmosis por <i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	<i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	Suelo con un elevado contenido en nitrógeno	Regiones tropicales de África	Levaduras de gemación de gruesa pared y mayor tamaño (8-15 μm); istmo prominente y cicatriz de gemación	Baja tasa de enfermedad pulmonar; mayor frecuencia de afectación cutánea y ósea
Paracoccidioidomicosis	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Probable asociación a suelo	Centro y Sudamérica	Levadura de gemación múltiple y pared delgada a moderadamente gruesa (15-30 μm)	Enfermedad pulmonar de resolución espontánea; la infección pulmonar progresiva y diseminación (piel, mucosa, huesos, ganglios linfáticos)

TABLA 71-4. Marcadores antigénicos, bioquímicos y moleculares para la detección directa de las micosis invasivas

Microorganismo	Componentes de la pared celular o cápsula	Antígenos citoplásmicos	Metabolitos	Secuencias de ADN genómico*
<i>Candida</i>	Mananos LA RIA EIA P-(1,3)-glucanos Prueba de usado de amebocitos de <i>Limulus</i> Quitina Espectrofotometría	Enolasa EIA Inmunotransferencia Anticuerpo anti-enolasa EIA Producto de 47 kDa procedente de la degradación de HSP-90 Enzimoinmunoanálisis o prueba de inmunováloration	D-arabinitol GLC/FID enzimático rápido Espectroscopia de masas/GLC	Gen de actina Gen de quitina-sintetasa Gen P450 ITS Genes de ARN ribosomal
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Polisacárido capsular LA EIA		D-manitol Espectroscopia de masas GLC	Genes de ARN ribosomal ITS GenURA5
<i>Aspergillus</i>	Galactomanano LA EIA RIA P-(1,3)-glucanos Prueba de lisado de amebocitos de <i>Limulus</i> Quitina Espectrofotometría		D-manitol GLC/FID Espectroscopia de masas/GLC	Gen P450 Genes de ARN ribosomal ITS Gen de proteasa alcalina Genes mitocondriales
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Pared celular RIA para proteína de adhesión de pared celular de 120 kDa			Genes de ARN ribosomal ITS
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Pared celular RIA y EIA para antígeno polisacarídico			Genes de ARN ribosomal ITS
<i>Penicillium marneffei</i>	Manoproteína de pared celular EIA			ITS

TABLA 74-2. Diagnóstico de las micosis dimórficas endémicas

Micosis	Cultivo	Morfología <i>in vitro</i>		Histopatología	Serología
		25 °C	37 °C		
Blastomicosis	Espudo, LBA, tejido pulmonar, biopsia cutánea	Filamentosa, conidias redondas a ovaladas o piriformes (diámetro 2-10 μm)	Levadura de gemación de base ancha y gruesa pared (8-15 μm)	Levadura de gemación de base ancha (20-80 μm)	Anticuerpos: FC, ID, EA (escasa sensibilidad y especificidad) Antígeno: orina (no se ha definido su rendimiento)
Coccidioidomicosis	Espudo, LBA, tejido	Micelio con artroconidias cilíndricas (3-6 μm)	NA	Esférulas (20-80 μm) que contienen endosporas	Anticuerpos: PT, FC, ID, APL (diagnóstica y pronóstica)
Histoplasmosis por <i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	Espudo, LBA, sangre, médula ósea, tejido	Micelio con artroconidias tuberculadas (8-15 μm) y pequeñas microconidias ovaladas (2-4 μm)	Pequeña levadura de gemación (2-4 μm)	Levadura intracelular de gemación (2-4 μm)	Anticuerpos: FC, ID Antígeno: suero y orina (sensibilidad del 92% en enfermedad diseminada)
Paracoccidioidomicosis	Espudo, LBA, tejido	Micelio, microconidias redondas (2-3 μm) y clamidosporas intercaladas	Levadura de gemación múltiple de gran tamaño (15-30 μm)	Levadura de gemación múltiple de gran tamaño	Anticuerpos: ID, FC (especificidad variable, FC útil para vigilar la respuesta)
Peniciliosis por <i>P. marneffei</i>	Sangre, médula ósea, tejido	Micelio con un pigmento rojo difundible; los conidióforos culminan en un penicilio conspicuo que porta conidias	Levadura alargada pleomorfa (1-8 μm) con tabiques transversales	Levadura alargada de vida intracelular con tabiques transversos	En fase de desarrollo

TRATAMIENTO

- ❑ En las formas benignas de la enfermedad, en individuos inmunocompetentes, generalmente no es necesario el tratamiento antimicótico.
- ❑ La anfotericina B constituye el antimicótico de elección para el tratamiento de la histoplasmosis. De los compuestos azólicos, uno de los más utilizados ha sido el ketoconazol, y en los últimos años, en inmunocompetentes, ha demostrado ser efectivo el tratamiento con itraconazol como primera opción y anfotericina B como alternativa, tanto para las formas pulmonares como diseminadas.
- ❑ En inmunocomprometidos o en aquellos pacientes con afectación del Sistema Nervioso Central se recomienda como única opción la anfotericina B y continuar con dosis de mantenimiento de itraconazol. El fluconazol también ha sido utilizado cuando hay compromiso del SNC en pacientes que no toleran el itraconazol.

GRACIAS