

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)
SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA MICOLOGÍA

**Histoplasmosis en Cuba:
Contribución a su diagnóstico,
prevención y control**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. Carlos Manuel Fernández Andreu

**Asesoras: Dra Nidia Rojas Hernández
Dra Alina Llop Hernández**

**La Habana
2004**

Agradecimientos

*La gratitud es el sentimiento más dulce
que conmueve el alma.
Máximo Gómez*

Este es un momento muy particular en toda tesis. Mostrar gratitud hacia todos aquellos que nos han aportado algo para su culminación resulta una obligación, más que un deber. Sin embargo, no es nada sencillo. En algunos casos la ayuda, apoyo o colaboración brindados han sido evidentes; pero en otros casos ha sido inaparente, sutil, aunque también imprescindible.

Mi agradecimiento a las Profesoras Nidia Rojas y Alina Llop, sin las cuales este trabajo no hubiera llegado a su fin. Gracias por sus enseñanzas.

Un reconocimiento muy especial al Dr Gerardo Martínez que ha sido parte de todo este trabajo.

En un estudio que ha abarcado un extenso período de tiempo, los agradecimientos pudieran parecer interminables, pero es necesario hacer algunas importantes menciones:

A mis compañeras del Laboratorio de Micología: Dianeya Mendoza, Mayda Perurena, María Teresa Illnait e Iliana Valdés por el entusiasta apoyo que me han brindado.

A todos los colegas y amigos del Departamento de Bacteriología Micología, con cuya colaboración siempre conté: Raúl Díaz, Carmen Fernández, Eduardo Valdés, Adalberto Águila, Isis Tamargo, Lilian Mederos, Dihadenys Lemus, Gilda Toraño, Rosabel Falcón, Kiomy Fuentes e Ibis Hernández.

A Clara Savón, Susana Vázquez, Virginia Capó y Roberto Fernández, por la revisión crítica del documento y por las sugerencias aportadas.

A la Dra Silvia Macola y al Dr Eddy Caro por la oportuna revisión y los valiosos aportes críticos al documento.

A Lázaro González, por el apoyo de siempre.

A René Gato, por su disposición constante a colaborar.

A Martha Rosa Hernández y Yoel Miranda por la desinteresada pero imprescindible ayuda.

A Ramón Arias, por sus oportunos consejos y la sincera amistad.

A Luis Morier, por estar siempre dispuesto a escuchar y ayudar.

A toda la subdirección docente del IPK, en especial a la Dra Nereyda Cantelar por todo el apoyo que he recibido de ella.

Por último, aunque quizás debió haber sido el primero, mi entero agradecimiento a los doctores Ramón Vidal y Enrique Font con quienes comencé mis estudios sobre el *quinto reino*.

Finalmente, un especial reconocimiento al Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), que como parte de nuestro sistema nacional de salud, nos ha permitido la realización de toda esta obra.

Lamentablemente en momentos como este siempre habrá omisiones involuntarias, pero sepan todos que guardo con profunda gratitud toda la colaboración brindada.

A todos muchas gracias.

A la memoria de mi padre
A mi madre

SÍNTESIS

Con el objetivo de profundizar en aspectos micológicos y ecológicos relacionados con el diagnóstico de la histoplasmosis en Cuba se realizó el presente trabajo. Se determinó la presencia de *Histoplasma capsulatum* en muestras de 30 cuevas (58,8 %) y, por primera vez en el país, se aisló *H. capsulatum* en lugares relacionados con aves domésticas y en espacios abiertos, así como en el 24 % de los murciélagos capturados, lo que reviste gran interés epidemiológico y confirma la importancia de estos mamíferos y sus hábitats como reservorio del hongo en la Naturaleza. Se incluye el aislamiento en la especie *Macrotus waterhousei minor*, hallazgo no encontrado anteriormente en la literatura internacional. La caracterización de las cepas se realizó según criterios morfológicos y se confirmó mediante la prueba de exoantígenos, la cual demostró ser de alta especificidad. El estudio comparativo de 4 brotes epidémicos permitió llegar al diagnóstico integral de la enfermedad, la identificación de la fuente de infección y la adopción de medidas de control siguiendo una metodología común que se propone para su aplicación en estudios posteriores. Para el diagnóstico serológico de estos brotes se empleó por primera vez en el país un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA el cual resultó de gran utilidad. La determinación, por primera vez en Cuba, de la sensibilidad de *H. capsulatum* frente a drogas antifúngicas, permitió corroborar la efectividad *in vitro* de la anfotericina B, el itraconazol y el ketoconazol, no así frente al fluconazol. Los resultados obtenidos han contribuido a un mayor conocimiento de diferentes aspectos relacionados con el diagnóstico, la prevención y el control de la histoplasmosis en nuestro país.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Sinonimia	8
2.2	Agente etiológico	8
2.3	Hábitat	12
2.4	Epidemiología	13
2.5	Patogenia	17
2.6	Manifestaciones clínicas	20
2.7	Histoplasmosis y SIDA	20
2.8	Histoplasmosis en Cuba	22
2.9	Diagnóstico	24
2.9.1	Productos patológicos	24
2.9.2	Examen microscópico directo	24
2.9.3	Cultivo e identificación	25
2.9.4	Conversión a fase levaduriforme	26
2.9.5	Prueba de exoantígenos	27
2.9.6	Identificación por técnicas de ácidos nucleicos	27
2.9.7	Inoculación en animales	28
2.9.8	Diagnóstico serológico	28
2.9.9	Prueba intradérmica de histoplasmina	31
2.9.10	Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> a los agentes antifúngicos	32
2.10	Principales drogas utilizadas en el tratamiento	33
3	MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1	Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> de muestras ambientales	36
3.1.1	Cuevas y otros hábitats	36
3.1.2	Métodos	36
3.2	Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> a partir de murciélagos	36
3.2.1	Materiales	36
3.2.2	Métodos	37
3.2.2.1	Captura y traslado al laboratorio	37
3.2.2.2	Obtención y procesamiento de las muestras	37
3.2.2.3	Aislamiento e identificación de <i>H. capsulatum</i>	38
3.3	Identificación de <i>H. capsulatum</i> por la prueba de exoantígenos	38
3.3.1	Materiales	38
3.3.2	Método	38
3.3.2.1	Identificación morfológica de las cepas	38
3.3.2.2	Conversión a fase levaduriforme	39

3.3.2.3	Prueba de exoantígenos	39
3.4	Caracterización integral de los brotes epidémicos de histoplasmosis	39
3.4.1	Muestras clínicas y ambientales	40
3.5	Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>H. capsulatum</i> frente a drogas antifúngicas	42
3.5.1	Materiales	42
3.5.2	Método	42
3.5.2.1	Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i>	43
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1	Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> a partir de muestras ambientales	46
4.2	Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> de murciélagos	51
4.3	Identificación de <i>H. capsulatum</i> por la prueba de exoantígenos	57
4.4	Caracterización de los brotes epidémicos de histoplasmosis relacionados con las cuevas estudiadas	61
4.5	Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>H. capsulatum</i> frente a drogas antifúngicas	77
5	DISCUSIÓN GENERAL	89
6	CONCLUSIONES	97
7	RECOMENDACIONES	99
8	BIBLIOGRAFIA	101
	ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis se define, según el Comité de Nomenclatura de las Micosis de la Sociedad Internacional de Micología Humana y Animal, como la infección causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Odds *et al.*, 1992), el cual por razones prácticas, se suele denominar *Histoplasma capsulatum*. Esta es una micosis del sistema fagocítico mononuclear, de gravedad variable que afecta pulmones, tejidos linfáticos, hígado, bazo, piel y mucosas, sistema nervioso central y otros órganos. La infección se inicia después de la inhalación de las partículas infectantes del hongo y a partir de ese momento pueden aparecer diversas manifestaciones clínicas.

Está considerada como la micosis más importante del continente americano. Puede presentarse a cualquier edad, aunque su mayor frecuencia está entre la 3ª y la 4ª décadas de vida. Algunos grupos ocupacionales son particularmente susceptibles a la infección por *H. capsulatum*, especialmente aquellos que realizan actividades en cuevas o ambientes naturales: campesinos, agricultores, criadores de aves, espeleólogos, mineros, entre otros (Velasco-Castrejón y González-Ochoa, 1977; González-Zepeda *et al.*, 1998). En los últimos años se ha observado cada vez con más frecuencia en turistas que visitan áreas endémicas (Wolff, 1999; Weinberg *et al.*, 2003; Salomon *et al.*, 2003); también puede considerarse con riesgo el personal que trabaja en laboratorios de Micología Médica (Ellis, 1994; González-Zepeda *et al.*, 1998).

Las manifestaciones clínicas varían desde formas asintomáticas o benignas (las cuales representan aproximadamente el 95 % de los casos en individuos inmunocompetentes), hasta las formas pulmonares agudas y crónicas y las diseminadas graves (Rippon, 1988). Es una de las micosis oportunistas más importantes en individuos con alteraciones de los mecanismos de defensa específicos mediados por células, particularmente en aquellos pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Johnson y Sarosi, 1994; Hajjeh *et al.*, 2001).

El diagnóstico de laboratorio de la histoplasmosis es complejo y debe abordarse de manera multilateral, teniendo en cuenta los criterios clínicos y epidemiológicos. En dependencia de las diferentes formas clínicas pueden ser de utilidad los exámenes directos, los cultivos en medios

adecuados, las tinciones específicas, las pruebas para la detección de antígenos y anticuerpos y las pruebas intradérmicas (Rippon, 1988; Wheat, 2003).

En Cuba, la incidencia exacta de esta micosis es difícil de precisar. Los primeros casos de histoplasmosis se conocen desde 1951 (Sanguily *et al.*, 1951). Sin embargo, los primeros brotes epidémicos se reportaron en la década de los años '60 (Nocedo Pous *et al.*, 1965) y desde entonces han continuado presentándose prácticamente en todas las provincias, relacionados fundamentalmente con la entrada en cuevas, la remoción del suelo y la alteración del microambiente interior, con la consecuente generación de aerosoles. Sin embargo, muchos de estos brotes no han podido ser confirmados por carecer de los recursos necesarios o por no contar con una metodología para su estudio integral.

Para determinar la presencia de *H. capsulatum* en la naturaleza es necesario realizar su búsqueda, aislamiento e identificación a partir de fuentes ambientales. En Cuba, Chang Puga y Font D'Escoubet (1974) aislaron por primera vez este hongo a partir de muestras de tierra procedentes de cuevas habitadas por murciélagos. Desde entonces, la mayoría de los aislamientos se han realizado en la región occidental.

Una de las principales dificultades del diagnóstico de laboratorio de la histoplasmosis es la demora en el aislamiento e identificación. Por ello, son de gran valor todas aquellas técnicas de laboratorio que contribuyan a un diagnóstico más rápido, específico y sensible, entre las que se pueden mencionar la prueba de exoantígenos y la técnica de ELISA (López Martínez *et al.*, 1995).

Por otra parte, como complemento del diagnóstico, a pesar de los grandes esfuerzos destinados a estandarizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* con drogas antifúngicas y lograr la adecuada correspondencia entre los resultados *in vitro* y la evolución de los pacientes sometidos a tratamiento antimicótico, son pocos los trabajos realizados con este fin en *H. capsulatum* (Perea y Patterson, 1999).

Desde 1981, el Laboratorio de Micología del IPK, como Laboratorio Nacional de Referencia, ha centrado de manera gradual los estudios epidemiológicos, clínicos y de diagnóstico de laboratorio relacionados con esta enfermedad en el país. En estos estudios resulta de incuestionable valor poder confirmar nuestras áreas endémicas, las cuales aún se desconocen.

Actualmente, todavía se confrontan serias dificultades en los laboratorios de la Red Nacional de Microbiología para el diagnóstico de esta micosis, lo que permite suponer la existencia de un subregistro no despreciable. Este panorama se torna todavía más complejo si se tiene en cuenta que la histoplasmosis ocupa, en los pacientes cubanos infectados por el VIH, el cuarto lugar en orden de frecuencia, entre las micosis, después de la neumocistosis, la candidiasis y la criptococosis (Arteaga Hernández *et al.*, 1998).

Por todo lo anteriormente expuesto, resulta de gran relevancia cualquier intento encaminado al mejor conocimiento de esta enfermedad y su agente causal en nuestro medio, lo cual contribuirá a evitar y controlar los brotes epidémicos así como su adecuado diagnóstico y tratamiento en Cuba, para lo cual hemos planteado la siguiente **HIPÓTESIS** :

El empleo de métodos de laboratorio para el estudio integral de la histoplasmosis permitirá determinar su endemicidad en Cuba y contribuirá a su diagnóstico, prevención y control.

Para confirmar esta hipótesis, los objetivos trazados fueron los siguientes:

OBJETIVO GENERAL:

Contribuir al diagnóstico, prevención y control de la histoplasmosis en Cuba.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la presencia de *H. capsulatum* en diferentes reservorios bióticos y abióticos de interés económico o social.
2. Contribuir al diagnóstico de la histoplasmosis y su agente causal en nuestro país mediante el empleo de valiosas técnicas como la prueba de exoantígenos y ELISA.

3. Caracterizar de forma integral diferentes brotes epidémicos de histoplasmosis ocurridos en nuestro país.
4. Evaluar la sensibilidad *in vitro* de cepas autóctonas de *H. capsulatum* frente a las principales drogas antifúngicas utilizadas en el tratamiento de la histoplasmosis.

El presente trabajo contiene los siguientes aspectos que constituyen **NOVEDAD CIENTÍFICA**:

- La presencia de *H. capsulatum* en cuevas y otros hábitats relacionados con murciélagos y aves, algunos de ellos de gran interés económico-social, lo que constituye, en muchos casos, el primer reporte en las respectivas localidades.
- Constituyen hallazgos de importancia epidemiológica el aislamiento de *H. capsulatum* en especies murciélagos de Cuba, entre ellos el primer reporte a nivel mundial en *Macrotus waterhousei minor* y el primero en *Tadarida brasiliensis muscula* en Cuba.
- Se diseñó una metodología integral que permitió la caracterización y control de brotes epidémicos de histoplasmosis la cual se propone para estudios posteriores en nuestro país.
- Se establecieron, por primera vez en el país, nuevos procedimientos de laboratorio y valiosas tecnologías que permiten un diagnóstico más rápido, específico y sensible y una identificación confirmatoria de *H. capsulatum*.
- Se presenta el primer estudio en Cuba sobre la sensibilidad *in vitro* de *H. capsulatum* frente a los cuatro agentes antifúngicos más empleados en la actualidad y la metodología estandarizada constituye una propuesta para la realización de estas pruebas.

VALOR TEÓRICO.- El presente documento contiene el estudio más completo realizado en Cuba de tipo ambiental y de laboratorio y por ello aporta nuevos conocimientos sobre la histoplasmosis y su agente causal en Cuba. Las investigaciones incluidas en esta tesis recibieron reconocimientos como: Premio en Jornada Científica de Animales de Zoológicos y Fauna Silvestre (1986), Resultados Relevantes del IPK (1987,1999), Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (1991) y Mención en el Forum Provincial de Ciencia y Técnica (2000). Estos resultados se encuentran publicados en 20 artículos científicos en revistas nacionales (12) y extranjeras (8) y en el capítulo de *Histoplasma capsulatum* del libro *Microbiología y Parasitología Médicas* (Premio de la Crítica Científico-

Técnica 2001, Premio Anual de la Salud 2002 y Ponencia Destacada XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica 2003). También aparecen registrados en la obra *Fungi of the Caribbean, an annotated checklist* (2001) y están incluidos en el estudio titulado “Diversidad y conservación de los hongos del Caribe”, Premio Relevante de la Academia de Ciencias de Cuba, 2003, en la sección de Ciencias Naturales; además, han sido presentado en 39 eventos científicos (23 nacionales y 16 internacionales). Han constituido temas de 1 Proyecto de Grado, 3 Trabajos de Diploma de la Licenciatura en Microbiología, 1 Trabajo de Terminación de Residencia en Microbiología y 1 Tesis de Maestría en Microbiología, defendidos durante el período 1988-2000.

VALOR PRÁCTICO.- Los resultados obtenidos permitieron la introducción de nuevas tecnologías de trabajo, más rápidas, específicas y sensibles para el diagnóstico de la histoplasmosis, la identificación de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, su sensibilidad a los antifúngicos y la determinación de los aspectos ecológicos más relevantes relacionados con este patógeno en nuestras condiciones. Gracias a estos resultados, el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK fue capaz de caracterizar la histoplasmosis como micosis oportunista en el curso del SIDA y acometer el estudio integral de brotes epidémicos, lo que ha constituido la base para la adopción de las medidas de prevención y control necesarias, todo lo cual forma parte de la "Metodología Integral para el estudio de la histoplasmosis" propuesta, de gran valor práctico y metodológico, para su uso a nivel nacional.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sinonimia.

La histoplasmosis ha recibido diferentes denominaciones a través del tiempo y en diferentes regiones geográficas (Lacaz *et al.*, 1991), tales como: enfermedad de Darling, reticuloendoteliosis, citomicosis reticuloendotelial, enfermedad de las cuevas, enfermedad de los murciélagos, enfermedad del Valle de Ohio, fiebre de Tingo María, fiebre de las minas abandonadas, histoplasmosis americana e histoplasmosis clásica. Estos dos últimos nombres han sido adoptados para diferenciarla de la “histoplasmosis africana” cuyo agente etiológico es *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (Gugnani y Muotoe-Okafor, 1997).

2.2. Agente etiológico.

Desde la antigüedad se ha sugerido la existencia de la histoplasmosis sobre la base de descripciones de su patogenia e historia natural, incluso se ha planteado que la causa de la muerte de los miembros de la expedición de Lord Carnavon a la tumba de Tutankamen fueron los conidios de *H. capsulatum* y no la maldición de “antiguos espíritus egipcios” (Mitchell, 1983). Se puede afirmar más objetivamente, que la historia de la histoplasmosis comienza en 1906 con los importantes hallazgos realizados por Darling a partir de la necropsia de un hombre de 27 años, que trabajaba en la construcción del canal de Panamá. Darling (1906) describió al microorganismo como “un parásito de forma ovoide a redonda, rodeado de un halo que no se colorea, con un grosor de aproximadamente 1/6 del diámetro del parásito”. Debido al parecido con *Leishmania*, pensó que se trataba de un protozoo y que el halo era una cápsula, por lo que lo denominó *Histoplasma capsulatum*. Ni era un protozoo, ni había realmente tal cápsula, pero el nombre ha perdurado hasta hoy. Los hechos más importantes en la historia de la enfermedad se muestran en el anexo 1.

El agente etiológico de la histoplasmosis es el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, al que se le suele denominar *H. capsulatum*. A temperaturas inferiores a 35°C crece como un hongo filamentoso de color blanco, mientras que a 37°C, tanto *in vitro* como en los tejidos del huésped su crecimiento es levaduriforme (Rippon, 1988).

El estado teleomorfo de esta especie fue descrito por primera vez en 1972, como un ascomiceto filamentoso, denominado *Emmonsella capsulata* (Kwon-Chung, 1972; Taylor *et al.*, 1999). Más tarde fue reubicado en el género *Ajellomyces*, el cual agrupa tres especies: *A. dermatitidis*, *A. crescens* y *A. capsulatus*, cuyos estados anamorfos o mitospóricos pertenecen a tres géneros distintos: *Blastomyces dermatitidis*, *Emmonsia crescens* e *Histoplasma capsulatum* respectivamente (Peterson y Sigler, 1998). Su ubicación taxonómica actual se muestra a continuación (López Martínez *et al.*, 1995):

Ubicación Taxonómica	Anamorfo	Teleomorfo
Clase	Deuteromycetes	Ascomycetes
Orden	Moniliales	Onygenales
Familia	Moniliaceae	Gymnoascaceae
Género	<i>Histoplasma</i>	<i>Ajellomyces</i>
Especie	<i>H. capsulatum</i>	<i>A. capsulatus</i>
Variedades	<i>H. capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	-
	<i>H. capsulatum</i> var. <i>duboisii</i>	-
	<i>H. capsulatum</i> var. <i>farcinosum</i>	-

Ajellomyces capsulatus es heterotálico; los dos tipos compatibles (+ y -) se han aislado con igual prevalencia en la naturaleza, pero casi el 90% de las infecciones son causadas por el tipo (-) (Gaur y Lichtwardt, 1980; Mitchell, 1983). En los cultivos se pueden observar cleistotecios de 100 a 150 µm de diámetro, con hifas peridiales laxas y ascas globulosas con ocho ascosporas elípticas, de 1,5 µm de diámetro y una pared celular lisa (Lacaz *et al.*, 1998; Negroni, 2001).

Su contenido de guanina-citosina está entre 45,4 y 49,8 %, con una media de 47,3 %. Los primeros estudios en este sentido han permitido separar los aislamientos de *H. capsulatum* en tres grupos, basados en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP); estos grupos se corresponden con los aislamientos de América del Norte, de América del Sur y con aislamientos termosensibles procedentes de pacientes de SIDA, cuya patogenicidad parece ser

menor (Carter *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999). Otros estudios, sin embargo, han demostrado que existe una gran variabilidad entre las cepas (De Hoog y Guarro, 1995; Carr y Shearer, 1998). Se desconoce a qué grupo pertenecen las cepas aisladas en nuestro medio.

A temperaturas inferiores a 35°C, *H. capsulatum* crece formando dos tipos de colonias: el tipo A (albino o blanco) y el tipo B (*brown* o pardo). El tipo A se caracteriza por desarrollar un micelio blanco, algodonoso, con abundantes hifas aéreas anchas; produce macroconidios y microconidios y no produce pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Las colonias del tipo B se observan con un micelio escaso, aplanado, de color canela a pardo oscuro con hifas pigmentadas estrechas y gran número de macroconidios tuberculados, con proyecciones en la superficie. Con frecuencia, entre los 10 y 14 días, la colonia se cubre de grandes masas de macroconidios y muy pocas hifas; los microconidios son escasos y se difunde un pigmento marrón oscuro en el medio (Berliner, 1968; De Hoog y Guarro, 1995). Microscópicamente estos microconidios se presentan sésiles (o en hifas cortas no diferenciadas), lisos, esféricos, piriformes o en forma de clava, sin septos, de pared fina, que pueden medir 1-4 x 2-6 µm. Los macroconidios se observan en conidióforos cortos, son generalmente esféricos (8-14 µm de diámetro), de paredes gruesas, sin septos, de aspecto tuberculado o con proyecciones cilíndricas, fácilmente apreciables al microscopio óptico (De Hoog y Guarro, 1995).

A menudo los primo-aislamientos son del tipo B, particularmente cuando se aíslan del suelo. Estos cultivos del tipo B al envejecer pueden llegar a cubrirse de un micelio blanco y transformarse en el tipo A, de manera irreversible (Lacaz *et al.*, 1998). Se ha señalado que el tipo B es más patógeno para animales de laboratorio (Taylor *et al.*, 1997).

En estado parasitario y en medios de cultivo enriquecidos, a 37°C, se observan células levaduriformes esféricas u ovaladas, de 2-3 x 3-4 µm, de paredes finas que se reproducen por gemación polar con una base estrecha. *In vitro* se desarrollan colonias cremosas de color grisáceo a beige (Lacaz *et al.*, 1998).

El paso de la fase filamentosa a levadura requiere, en primer lugar, de un cambio de temperatura de 25-30°C a 37°C y se considera un evento necesario para la expresión de los genes de virulencia (Taylor y Reyes Montes, 2002). Este proceso ha sido dividido en tres etapas: la primera etapa comienza inmediatamente después del cambio de temperatura, con una rápida disminución del adenosín-trifosfato (ATP) intracelular, seguido de una fosforilación oxidativa y una disminución progresiva del ritmo respiratorio. Entre las 24 y 48 horas las células entran en un período de latencia (etapa 2) que dura de 4 a 6 días, en esta etapa las células presentan una marcada disminución de las concentraciones de los componentes del transporte de electrones mitocondrial. La etapa 3 se caracteriza por un reinicio de la respiración normal, inducción de la cisteína-oxidasasa específica y la terminación de la transición a levadura (Medoff *et al.*, 1986; San Blas, 1992).

Durante la transformación, las hifas se fragmentan y dan lugar gradualmente a las levaduras. No ocurre el cambio a partir de los conidios. El conidio primero germina y después ocurre la conversión gradual a levadura. Los brotes o yemas aparecen en el extremo más estrecho de la célula madre y permanecen unidas por una hebra angosta. Al ser coloreadas con Giemsa, las células de *H. capsulatum* muestran un solo núcleo con un nucleolo densamente teñido. Al principio la colonia es no vellosa y microscópicamente se puede observar una mezcla de hifas en proceso de conversión y células levaduriformes en gemación; en los siguientes subcultivos la colonia se convierte gradualmente en una colonia blanca grisácea, lisa y levaduriforme (Rippon, 1988).

La pared celular de *H. capsulatum* está formada principalmente por α -1,3 glucano, β -1,3 glucano y quitina. En comparación con otros hongos patógenos dimórficos, el contenido de quitina es superior en este hongo. Sin embargo, existen diferencias en la composición de glucanos en las dos fases: α -1,3 glucano es el componente principal de la fase levaduriforme, mientras que en la micelial es superior el contenido de β -1,3 glucano (Hearn, 1997). La presencia de altos niveles de α -1,3 glucano se ha asociado con la virulencia de la cepa (Rippon, 1988), aunque se ha sugerido

también la posibilidad de que una misma cepa pueda pasar del fenotipo α -1,3 glucano⁽⁺⁾ al α -1,3 glucano⁽⁻⁾ y viceversa, lo que pudiera ayudar a explicar la existencia de formas crónicas y latentes de histoplasmosis (Hearn, 1997).

Otro componente importante, aunque se encuentra en menor cantidad, es un galactomanano situado en la capa más externa de la pared, el cual se considera el principal polisacárido antigénico de *H. capsulatum*; otros galactomananos son responsables de reacciones cruzadas con *Blastomyces dermatitidis* y *Paracoccidioides brasiliensis* (Hearn, 1997).

2.3. Hábitat.

H. capsulatum crece en suelos con alto contenido de nitrógeno y fosfatos, asociados generalmente al depósito y acumulación de excretas de aves y de murciélagos. Se ha aislado de suelos ligeramente ácidos y de baja permeabilidad; con frecuencia las concentraciones más altas del hongo se encuentran en la superficie, aunque también se ha encontrado a 25 pulgadas de profundidad (Goodwin *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1994).

No son conocidos todos los factores que influyen en el buen desarrollo del hongo en el suelo, pero se sabe que *H. capsulatum* puede crecer en diferentes tipos de suelos, cuyas características, a su vez, determinan la microbiota que puede estar presente. Puede tolerar bajas temperaturas (hasta -18°C) si el contenido de humedad es adecuado, pero es incapaz de crecer por encima de 40°C por períodos prolongados. Puede crecer en rangos de pH entre 5 y 10 y requiere oxígeno para sobrevivir y desarrollar su fase filamentosa (Lappe *et al.*, 1998).

Aunque esta especie crece en abundancia sólo en condiciones ambientales relativamente restringidas, *H. capsulatum* se ha encontrado en los cinco continentes (Chin, 1999). Las zonas de mayor endemidad se localizan en regiones tropicales y subtropicales con una temperatura media anual de 22-29°C, una humedad relativa de 60-80 % y un promedio de precipitación anual de aproximadamente 1 000 mm. Estas condiciones parecen ser las más favorables para su

proliferación y se han denominado "espacios abiertos", aunque este hongo también se ha encontrado en áreas geográficas con condiciones climáticas muy diversas. Generalmente, estas últimas se relacionan con la existencia de cavernas habitadas por murciélagos o aves y se consideran "espacios cerrados" (Rippon, 1988; Taylor *et al.*, 1997).

2.4. Epidemiología.

Gran parte de los conocimientos actuales en relación con la epidemiología de la histoplasmosis provienen del empleo de la prueba cutánea de histoplasmina en encuestas realizadas a partir de 1945 en diferentes regiones del mundo, lo que ha permitido delimitar las áreas endémicas y determinar la prevalencia de la enfermedad (Fava y Fava Netto, 1998; Taylor *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001).

La región de mayor endemidad en el mundo se localiza en el centro-este de los Estados Unidos, a lo largo de los valles de los ríos Ohio, Mississippi y Misouri, donde el 80-90% de la población suele ser positiva a la prueba de histoplasmina. Otras zonas endémicas importantes se localizan en Centro y Suramérica y las Antillas (Ashmeade-Dyer *et al.*, 1979; Hay *et al.*, 1981; Naiff *et al.*, 1988; Van Gelderen de Komaid *et al.*, 1992; Fava y Fava Netto, 1998; Salomon *et al.*, 2003). También se ha descrito la enfermedad en Asia, Africa, Australia y Oceanía (Ajello *et al.*, 1977; Hunt *et al.*, 1984; Padhye *et al.*, 1994; Imwidthaya, 1994; Wen *et al.*, 1996; Monchy *et al.*, 1998; Fujio *et al.*, 1999). En Europa los informes de casos autóctonos son escasos (Sotgiu *et al.*, 1970; Dupont, 1998; Gascón *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2000; Lamagni *et al.*, 2001). En los últimos años son cada vez más frecuentes los reportes de histoplasmosis entre turistas o investigadores científicos europeos que han visitado cuevas en distintos países de América (Torres Rodríguez, 1991; Van Crevel *et al.*, 1997; Valdez y Salata, 1999; Erkens *et al.*, 2002; Flor *et al.*, 2003; Salomon *et al.*, 2003).

Los aislamientos de *H. capsulatum* de muestras ambientales han contribuido también al conocimiento de su biología y ecología y la localización de las fuentes de infección de los brotes

epidémicos de histoplasmosis (Otcenášek *et al.*, 1967).

Algunas de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se presentan con mayor frecuencia a determinadas edades. Por ejemplo, la forma pulmonar aguda suele presentarse en adultos jóvenes, mientras que las formas diseminadas progresivas tienen mayor incidencia en niños, en mayores de 50 años y en pacientes inmunocomprometidos (Lacaz *et al.*, 1991; Severo *et al.*, 1998).

Durante la niñez, ambos sexos son igualmente susceptibles, pero en adultos se presenta más en el hombre que en la mujer. Durante mucho tiempo se ha señalado como causa de este hecho la mayor exposición del hombre a posibles fuentes de infección; sin embargo, también se ha comprobado el efecto inhibitorio de los estrógenos sobre el crecimiento de *H. capsulatum* (Negroni, 1982; Taylor y Reyes-Montes, 2002).

Según algunos autores, las formas pulmonares evolutivas son 25 veces más frecuentes en los individuos de la raza blanca que en los negros (Torres-Rodríguez, 1991; Bonifaz, 2000); sin embargo, Wheat *et al.* señalan la raza negra como uno de los principales factores asociados a las manifestaciones severas de la histoplasmosis en el SIDA (Wheat *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que la susceptibilidad a la infección por *H. capsulatum* puede estar relacionada con determinados genes del sistema principal de histocompatibilidad. En estudios realizados en la población mexicana se ha encontrado que los alelos HLA-B17 y HLA-B22 son frecuentes en pacientes con histoplasmosis pulmonar primaria. Sin embargo, se requieren estudios más amplios que permitan profundizar en estos y otros aspectos de la inmunogenética de esta micosis (Taylor *et al.*, 1997; Zúñiga-Ramos *et al.*, 1998; Taylor y Reyes Montes, 2002).

La histoplasmosis animal es conocida desde 1934 por los trabajos de DeMombreum en perros; es precisamente en esta especie animal donde la enfermedad se presenta clínicamente muy semejante a la enfermedad humana (Davies y Colbert, 1990). El microorganismo se ha aislado de numerosas especies de mamíferos entre las que se encuentran quirópteros, marsupiales, insectívoros, primates,

roedores, carnívoros, etc. (Otcenášek *et al.*, 1967; Naiff *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1994; Vargas-Yáñez *et al.*, 1998). Entre los animales domésticos, son los perros y los gatos los más afectados, en los cuales las infecciones suelen ser sistémicas, de tipo piogranulomatoso, principalmente en animales jóvenes (Pérez y Carrasco, 2000). Se han descrito diferencias clínicas entre la histoplasmosis canina en los EEUU y en Japón. En este último, los animales afectados presentan múltiples focos granulomatosos y ulcerados en piel y mucosa bucal, sin lesiones pulmonares ni gastrointestinales (Ueda *et al.*, 2003)

La mayoría de los brotes de histoplasmosis han ocurrido por la realización de determinadas actividades en lugares donde se acumulan excretas de aves o murciélagos; estas actividades generan gran cantidad de aerosoles que contienen las partículas infectantes del hongo, las cuales pueden ser fácilmente diseminadas por el viento (Chin, 1999). Según Goodwin *et al.*, en una amplia revisión realizada, los casos de transmisión por vía percutánea han sido muy escasos. Se ha señalado también la transmisión sexual de la enfermedad en una paciente con ulceraciones de la mucosa vaginal y adenopatías inguinales, cuyo esposo presentaba una histoplasmosis diseminada con úlceras en el pene. También se ha postulado una posible puerta de entrada gastrointestinal, aunque no ha sido convincentemente demostrada (Goodwin *et al.*, 1981). De manera excepcional, se ha reportado la transmisión, a partir del donante, en transplantes de riñón (Watanabe *et al.*, 1988; Wong y Allen, 1992; Limaye *et al.*, 2000).

Una de las mayores epidemias de histoplasmosis que han ocurrido tuvo lugar en Indianápolis, EE.UU., en la cual se estima que unas 100 000 personas fueron infectadas, 400 enfermaron y 75 presentaron la forma diseminada de la enfermedad. Esta epidemia se presentó en diversos puntos de la ciudad y es un ejemplo típico de la llamada “histoplasmosis urbana”, asociada a espacios abiertos (Wheat, 1992).

Algunos casos de histoplasmosis urbana han sido asociados al uso de fertilizantes orgánicos en huertos y jardines en áreas urbanas (Meals y McKinney, 1998; Jiménez *et al.*, 2002).

Los conocimientos acerca de la epidemiología de la histoplasmosis se han basado en los reportes de casos clínicos, los resultados de las encuestas con la prueba intradérmica de histoplasmina, los aislamientos del agente etiológico en la Naturaleza y algunos estudios llevados a cabo en animales. Sin embargo, en los últimos años, el empleo de técnicas moleculares ha estado brindando importante información sobre nuevas zonas endémicas o la redefinición de las ya conocidas, el estudio de brotes epidémicos precisando la fuente de infección, así como la caracterización de los aislamientos según el estado inmunitario del paciente, su zona de residencia y el origen exógeno o endógeno de la infección. Entre las técnicas basadas en el estudio del ADN, las de mejores resultados han sido las conocidas como RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, siglas en inglés) y RAPD-PCR (polimorfismo del ADN amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa, siglas en inglés) (Reyes-Montes *et al.*, 1999; Reyes-Montes *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2000). Esta última ha sido la más útil en la caracterización de cepas y ha sugerido la existencia de patrones según áreas geográficas (Taylor *et al.*, 2000; McEwen *et al.*, 2000; Perrotta *et al.*, 2001; Muniz *et al.*, 2001; Taylor y Reyes-Montes, 2002).

En la actualidad, aunque se han hecho diversos estudios con este fin, no existen vacunas preventivas ni terapéuticas para el control de la histoplasmosis (Polonelli *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente se ha podido aislar una proteína de la familia de las *hsp 60* (*heat shock proteins* o proteínas de choque térmico) obtenida de un extracto de pared y membrana celulares de la fase levaduriforme de *H. capsulatum*, que ha demostrado poseer capacidad protectora en animales de experimentación (Deepe, 1997; Deepe y Seder, 1998). Esta proteína también se ha obtenido por vía recombinante, y se ha logrado inducir una respuesta inmune protectora en ratones retados por vía intranasal con un inóculo letal de la fase levaduriforme del hongo. Otras dos proteínas recombinantes (antígeno H y *hsp 70*) han demostrado poseer capacidad de inducir una respuesta inmune celular pero sin efecto protector (Dixon *et al.*, 1998); sin embargo, más recientemente, se ha podido demostrar el valor del antígeno H como inmunógeno protector frente a la infección pulmonar por *H. capsulatum* en ratones (Deepe y Gibbons, 2001). Estos estudios,

aunque preliminares, pudieran servir de base para las fases siguientes de la producción y evaluación de futuros candidatos vacunales contra la infección por *H. capsulatum*.

2.5. Patogenia.

Aunque todavía se desconocen muchos de los mecanismos relacionados con la patogenia de *H. capsulatum*, los principales determinantes de virulencia conocidos son los siguientes (Retallack y Woods, 1999; Woods *et al.*, 2001; Woods, 2003):

- Formación de microconidios en el morfotipo filamentoso.
- Dimorfismo térmico.
- Parasitismo intracelular de macrófagos y supervivencia en el fagolisosoma.
- Modulación del pH en el microambiente.
- Producción de catalasas.
- Producción de sideróforos y capacidad de reducir los iones férrico (Fe^{3+}).
- Producción de proteínas fijadoras de calcio.
- Fenotipo rugoso (α -1-3 glucano en la pared celular).

Recientemente se ha señalado, al igual que en otros hongos patógenos, la producción de pigmentos tipo melanina como factor de virulencia en *H. capsulatum* (Nosanchuk *et al.*, 2002; Nosanchuk y Casadevall, 2003).

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 huésped. Entre los 3 y 5 días después de la inhalación, los microconidios germinan dando lugar al desarrollo de la fase levaduriforme (forma parasitaria) en el parénquima pulmonar. Los microconidios inhalados inducen una respuesta de neutrófilos en 24 horas, los cuales son responsables de la respuesta primaria inespecífica, a nivel pulmonar (Rippon, 1988).

Los neutrófilos pueden ser fungicidas frente a los microconidios, sin embargo, esta actividad no es

tan evidente frente a las levaduras de *H. capsulatum*. Los macrófagos se acumulan rápidamente y fagocitan a estas levaduras. En el huésped inmunodeprimido las levaduras individuales proliferan rápidamente en el interior de los macrófagos. Este acúmulo excesivo de microorganismos intracelulares puede inducir un *bloqueo* de los macrófagos, el cual retarda el desarrollo de la inmunidad específica del huésped. El proceso exudativo temprano da como resultado una neumonitis que se hace más extensa unas dos semanas después de la exposición (George y Penn, 1993).

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

Se ha demostrado que los hongos patógenos primarios, incluyendo *H. capsulatum*, son altamente resistentes al ataque de los neutrófilos cuando se encuentran en su fase levaduriforme, contrariamente a lo que ocurre con los hongos oportunistas, los cuales son fácilmente eliminados por los neutrófilos. Las levaduras de *H. capsulatum* son rápidamente ingeridas por los neutrófilos, pero ellas son intrínsecamente resistentes a la muerte oxidativa intracelular. Esto puede explicar la relativa inefectividad de la respuesta temprana de los neutrófilos en la histoplasmosis y la necesidad de una respuesta inmune específica para alcanzar la curación del enfermo (George y Penn, 1993).

Los linfocitos T desempeñan un papel vital en la respuesta frente a *H. capsulatum*. La resolución de la infección está condicionada por el desarrollo de una respuesta de linfocitos T específicos en alrededor de dos semanas. Los linfocitos T auxiliares activan los macrófagos, aumentando sus capacidades fungicidas y estimulando la formación de granulomas. Por otra parte, las células *natural killer* son capaces de eliminar el hongo extracelularmente y la presencia de anticuerpos anti-*H. capsulatum* incrementa la capacidad fungicida de estas células (Deepe y Seder, 1998).

La inmunidad celular parece disminuir en ausencia de una re-exposición ocasional y la prueba

cutánea de histoplasmina puede eventualmente tornarse negativa. Es posible, aunque está poco documentado, que la re-exposición a un inóculo fuerte pueda vencer los mecanismos de defensa del organismo, dando como resultado una nueva infección (Negroni, 1982).

En pacientes con alteraciones de la respuesta inmune celular, la infección por *H. capsulatum* no suele ser controlada y hay tendencia a la diseminación progresiva. La infección se extiende a varios órganos incluyendo médula ósea, hígado, bazo y glándulas suprarrenales (Vail *et al.*, 2002). Generalmente, la diseminación progresiva de la histoplasmosis, en estos casos, se desarrolla en un corto período después de la exposición, no obstante, en ocasiones puede demorar 2 ó más años en dependencia del estado inmunitario del paciente. La enfermedad diseminada puede afectar, además, al sistema nervioso central, las articulaciones, los huesos, las válvulas cardíacas o los vasos sanguíneos. En el 90 % de las autopsias se ha observado un daño en las suprarrenales, pero la insuficiencia suprarrenal sólo es reconocida clínicamente en el 10 % de los casos (George y Penn, 1993).

De manera general, la inmunidad protectora en la histoplasmosis se basa en la interacción coordinada entre ciertos componentes celulares (principalmente macrófagos, aunque también las células NK y los leucocitos polimorfonucleares) y la liberación de citoquinas (fundamentalmente IFN- γ , TNF- α e IL-12) (Allendoerfer y Deepe, 1998).

Los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (con una profunda deficiencia de la función de los linfocitos T) pueden desarrollar un síndrome similar al de una septicemia con shock, distress respiratorio y coagulación intravascular diseminada (Wheat *et al.*, 1985).

2.6. Manifestaciones clínicas.

La gran mayoría de las infecciones por *H. capsulatum* cursan de forma asintomática (90-95 %) y se detectan por la respuesta intradérmica a la prueba de histoplasmina y, en algunos casos, por la

presencia de focos pulmonares de calcificación en la imagen radiológica (Rippon, 1988). Sin embargo, entre el 5 y el 10 % de los infectados presenta una sintomatología muy variable que depende en gran medida del número de conidios inhalados y del estado inmunitario del huésped (Torres-Rodríguez, 1991). Las manifestaciones clínicas de la histoplasmosis han sido estudiadas y clasificadas por diferentes autores (Rippon, 1988; Bonifaz, 2000) y la mayoría de ellos coincide en que las formas más frecuentes son: histoplasmosis pulmonar aguda, histoplasmosis pulmonar crónica, histoplasmosis progresiva diseminada, histoplasmosis cutánea primaria e histoplasmosis. Independientemente de esta clasificación general, existen en la literatura médica numerosos reportes de casos que, por sus características clínicas, se pueden considerar formas atípicas o poco frecuentes de presentación (Randhawa *et al.*, 1995; Mignogna *et al.*, 2001; Laochumroonvorapong *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 2001; Paphitou y Barnett, 2002; Rivierez *et al.*, 2002; Mukunyadzi *et al.*, 2002). Las características clínicas de cada una de estas formas se explican con más detalles en el anexo 2.

2.7. Histoplasmosis y SIDA.

Desde los primeros momentos de la aparición del SIDA, la candidiasis y la criptococosis se destacaron como importantes infecciones oportunistas. No ocurrió lo mismo con ninguna de las cuatro grandes micosis endémicas (Graybill, 1988; Johnson y Sarosi, 1994; Kappe *et al.*, 1998). Aún hoy continúan siendo raras en estos pacientes la blastomicosis y la paracoccidioidomicosis (Perfect *et al.*, 1993; Shikanai-Yasuda *et al.*, 1995; Tobon *et al.*, 1998). Sin embargo, los pacientes de SIDA infectados con *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* son cada vez más numerosos en aquellas regiones donde estas micosis son endémicas, lo que ha dado lugar a que las micosis causadas por estos dos patógenos hayan sido consideradas desde 1987 entre las infecciones oportunistas que definen un caso de SIDA según el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, EE.UU. (Johnson y Sarosi, 1994; Kappe *et al.*, 1998; Ampel, 1999; Mensa-Pueyo *et al.*, 2002; Corti *et al.*, 2004).

La incidencia de histoplasmosis entre los pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) varía en dependencia de la endemicidad de cada región (Johnson *et al.*, 1988). Así, por ejemplo, en Indianápolis se ha informado hasta un 30 % de positividad entre los infectados por este virus, mientras que en Texas, sólo se reporta entre 4 y 5 % (Johnson y Sarosi, 1994). Según datos informados por Pérez *et al.* (1993), la histoplasmosis diseminada se presenta en el 4,2 % de los pacientes cubanos de SIDA.

La forma de presentación más frecuente en estos pacientes, la histoplasmosis diseminada progresiva, no es específica y generalmente aparece como una enfermedad sistémica febril, insidiosa, con hepatoesplenomegalia, semejante a muchas otras infecciones oportunistas que se manifiestan como complicación de la infección por el VIH (Lopes *et al.*, 1994; Hajjeh *et al.*, 2001). Una forma similar de histoplasmosis ya se había descrito en la era pre-SIDA con un mal pronóstico, sobre todo en niños (Goodwin *et al.*, 1981; Severo *et al.*, 1998; Lacaz *et al.*, 1999) y se conocía su asociación con los diferentes estados de inmunodeficiencia en los cuales adopta una forma grave y fatal. No es sorprendente que la infección por el VIH, con su destrucción profunda de los mecanismos de inmunidad celular, sea un factor predisponente para el desarrollo de esta forma grave de histoplasmosis (Graybill, 1988; Wheat, 1992; Johnson y Sarosi, 1994; Hajjeh *et al.*, 2001).

De manera general, en estos pacientes, el diagnóstico de laboratorio de la histoplasmosis continúa siendo difícil: los síntomas y signos no son específicos, los hemocultivos tienen baja sensibilidad, la respuesta inmune humoral específica está disminuida y el estado general de los pacientes muchas veces no permite el empleo de procedimientos invasivos (Fernández Andreu *et al.*, 1996; Stevens, 2002).

2.8. Histoplasmosis en Cuba.

Los estudios sobre la histoplasmosis en Cuba comenzaron en 1951, cuando fue informado el primer caso, cuyo diagnóstico de certeza se realizó mediante el cultivo e identificación de *H.*

capsulatum a partir de muestras de sangre periférica, médula ósea y biopsia de la lengua (Sanguily *et al.*, 1951). Ese mismo año Barquet *et al.* informaron un segundo caso: un niño de tres años de edad con adenopatías generalizadas y síndrome febril prolongado, anorexia y pérdida de peso (Barquet *et al.*, 1951). También en esa ocasión se logró aislar el hongo a 25°C y 37°C.

Estos dos casos impulsaron la realización de encuestas epidemiológicas mediante la prueba intradérmica de histoplasmina. La primera de ellas, en 1952, evidenció que el 20,5 % de los individuos estudiados (195 pacientes hospitalizados por diferentes causas) habían tenido una exposición anterior al hongo (Pardo *et al.*, 1952). A partir de 1960 se realizan otras encuestas, las cuales han sido limitadas tanto por el número como por el grupo poblacional de los casos incluidos (Fuentes y Madiedo, 1960; De Armas Pérez *et al.*, 1978; Castillo Méndez *et al.*, 1988; Suárez Hernández *et al.*, 1992).

Los tres primeros brotes epidémicos de histoplasmosis en Cuba, de los cuales se tienen referencias, ocurrieron en las provincias de Matanzas, La Habana y Pinar del Río y fueron publicados en la literatura médica en 1965 (Nocedo Pous *et al.*, 1965). El primero de ellos afectó a más de 300 personas y se considera uno de los mayores registrados en el mundo hasta ese momento. Otros brotes han sido descritos en las provincias de Ciudad de La Habana, La Habana, Matanzas, Pinar del Río, Ciego de Avila y el municipio de la Isla de la Juventud (Grupo Epidemiológico Central de las FAR, 1966; González Ochoa, 1983; González Menocal *et al.*, 1990). También han ocurrido brotes epidémicos en Villa Clara, Cienfuegos, Las Tunas, Holguín y Guantánamo, pero la información que se tiene sobre ellos es incompleta.

Entre los iniciadores de los estudios sobre histoplasmosis en Cuba, en las décadas de los años '60 y '70, también es necesario mencionar al Dr Ramón Vidal, que aunque no dejó obra publicada sobre el tema, supo sembrar en sus continuadores el interés por esta especialidad.

Los trabajos relacionados con el aislamiento de *H. capsulatum* del suelo comenzaron a ser publicados en Cuba en 1974 con el primer aislamiento del medio ambiente en un brote epidémico ocurrido entre soldados que penetraron en una cueva de la provincia de La Habana (Chang Puga y Font D'Escoubet, 1974). Al año siguiente se amplía este estudio a partir de muestras de otras cuevas y de un silo subterráneo en la misma provincia (Font D'Escoubet *et al.*, 1975).

Los estudios sobre la histoplasmosis animal en Cuba han sido escasos. *H. capsulatum* ha sido aislado a partir de vísceras (hígado, bazo y pulmones) de cuatro especies de murciélagos. Los estudios serológicos en estos quirópteros, realizados mediante la inmunodifusión doble, han sido negativos (Font D'Escoubet y Macola Olano, 1976). Los mismos autores llevaron a cabo la determinación de anticuerpos anti-*H. capsulatum* en 11316 muestras de sueros de ganado bovino, ovino, equino y porcino de la provincia de La Habana y sólo se obtuvieron resultados positivos, mediante la misma técnica serológica, en el 2,62 y el 0,07 % de las muestras de porcinos y bovinos, respectivamente (Macola Olano y Font D'Escoubet, 1977). En Cuba, la infección no se ha reportado en otras especies animales, domésticas ni silvestres.

La letalidad de la histoplasmosis en Cuba se puede considerar baja en comparación con otros países (Vaca-Marín *et al.*, 1998; Velasco-Castrejón, 1998); hasta 1980, sólo se habían reportado tres fallecidos, cuya causa de muerte se asoció directamente con esta micosis (Pila Pérez *et al.*, 1980).

Los primeros casos de histoplasmosis asociada a la infección por el VIH se informaron en 1990 (Capó de Paz *et al.*, 1990; Millán Marcelo *et al.*, 1990). Desde entonces, la histoplasmosis se presenta como una de las micosis más importantes por su relativa frecuencia y gravedad en los pacientes cubanos de SIDA (Arteaga Hernández *et al.*, 1998).

2.9. Diagnóstico.

El diagnóstico de laboratorio de la histoplasmosis se basa en técnicas de cultivo, microscopía y la

detección de antígenos y anticuerpos (Stevens, 2002; Wheat, 2003).

2.9.1. PRODUCTOS PATOLÓGICOS. Cuando se sospecha histoplasmosis en un paciente, los 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, piel, ganglios, etc), en dependencia del cuadro clínico (Arango y Castañeda, 1995; Mukunyadzi *et al.*, 2002).

2.9.2. EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO. El examen directo de las muestras, sin coloración previa, resulta de muy poco valor diagnóstico debido al pequeño tamaño de las levaduras. Sin embargo, los frotis coloreadas con Giemsa o Wright son de gran ayuda en el diagnóstico de la histoplasmosis (Arango y Castañeda, 1995).

Mediante la coloración de Giemsa las levaduras de *H. capsulatum* se observan dentro de los macrófagos, pequeñas (2-3 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 (Arango y Castañeda, 1995). Al romperse los macrófagos parasitados debido a una multiplicación intracitoplasmática excesiva, las levaduras son liberadas y pueden ser observadas extracelularmente.

La sensibilidad del examen microscópico directo, en general, es baja, incluso con coloraciones, aunque está en dependencia de la forma clínica: 10 % en la histoplasmosis pulmonar aguda, 40 % en la pulmonar crónica y <25 % en la diseminada (Wheat, 2003).

En los cortes histológicos, la pared de la levadura se tiñe muy débilmente con hematoxilina-eosina (HE), aunque se destaca con las coloraciones de ácido peryódico de Schiff (PAS), Gram y plata metenamina de Grocott-Gomori. Estas coloraciones permiten observar además, la respuesta hística del hospedero: en individuos inmunodeprimidos, esta respuesta es pobre y se observan abundantes levaduras en el interior de macrófagos, mientras que en los inmunocompetentes el

hongo evoca una reacción granulomatosa, con predominio de células epitelioides y gigantes, en cuyo interior se observan las levaduras (Arango y Castañeda, 1995; Lachmanan *et al.*, 2001).

La observación en cualquier tipo de muestra clínica, de levaduras intracelulares con las características mencionadas es altamente sugestiva de histoplasmosis; sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunas células pequeñas de *Cryptococcus neoformans* pobremente encapsuladas, así como también las células de *Penicillium marneffei* y *Candida glabrata* pueden crecer intracelularmente y pudieran confundirse con *H. capsulatum*. De igual forma, en los exámenes histológicos las formas pequeñas de *Blastomyces dermatitidis*, las endosporas libres de *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* y las especies de *Leishmania* y *Microsporidium* pudieran también ser confundidos con *H. capsulatum* (Kaufman, 1992; Wheat, 2003).

2.9.3. CULTIVO E IDENTIFICACIÓN. Es indiscutible que los cultivos son los que dan el diagnóstico definitivo de la histoplasmosis (Wheat, 2003). Sin embargo, no en todos los casos son factibles de obtener. Para lograr una máxima sensibilidad, se recomienda la siembra de muestras seriadas en medio agar Sabouraud glucosado y agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y cicloheximida, y su incubación a 28°C. El material patológico debe paralelamente sembrarse 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 (De Hoog y Guarro, 1995). También se ha recomendado, para el primo-aislamiento, el agar extracto de levadura-fosfatos, con hidróxido de amonio (López-Martínez *et al.*, 1995).

La macromorfología colonial de *H. capsulatum* resulta difícil de diferenciar de la de algunos hongos contaminantes e incluso de algunos patógenos, por lo que se hace imprescindible observar la presencia de los macroconidios tuberculados y demostrar su dimorfismo. Hongos saprófitos como *Chrysosporium* spp. y *Sepedonium* spp. también producen macroconidios equinulados muy semejantes a los de *H. capsulatum*, aunque a diferencia de éste, no crecen a 37°C (López-

Martínez *et al.*, 1995).

El tiempo de incubación de las muestras debe ser de 2 a 4 semanas, aunque según la mayoría de los autores es recomendable esperar hasta 6-8 semanas; otros, en cambio, prefieren esperar hasta las 12 semanas antes de considerar una muestra negativa (Rippon, 1988). Sin embargo, en un estudio reciente se encontró que el 93 % de los cultivos de *H. capsulatum* habían crecido antes de los 21 días (Hove y Woods, 1997).

En el laboratorio, tanto las muestras de pacientes como los cultivos de *H. capsulatum* deben manipularse con precauciones extremas y deben cumplirse las medidas generales de bioseguridad y las correspondientes al trabajo con gérmenes patógenos de riesgo 3, las cuales recomiendan la realización del trabajo en cabinas de seguridad biológica tipo BSL-3 (Ellis, 1994; De Hoog, 1996; Padhye *et al.*, 1998).

2.9.4. CONVERSIÓN A FASE LEVADURIFORME. Esta prueba se considera un paso confirmatorio en la identificación de *H. capsulatum*. Teniendo en cuenta que hay cepas atípicas de este hongo que no esporulan y considerando también la semejanza de sus macroconidios con los de *Chrysosporium*, *Sepedonium*, *Renispora* y *Arthroderma* se le ha dado gran valor a la conversión de la fase filamentosa a la levaduriforme para un diagnóstico definitivo (López-Martínez *et al.*, 1995). Este es un proceso gradual y lento y, en ocasiones, difícil de obtener. Para lograrlo se debe transferir un fragmento de la colonia filamentosa de *H. capsulatum* a un medio enriquecido (agar infusión de cerebro y corazón con o sin sangre de carnero, agar sangre con glucosa y cisteína) e incubar a 37°C. Deben realizarse subcultivos sucesivos en las mismas condiciones hasta hacer evidente el cambio a levadura (Bonifaz, 2000).

La presencia de los grupos -SH₂ que aporta la cisteína favorece el cambio de la forma micelial a la levaduriforme. Se ha podido establecer que esta transformación no ocurre directamente de los conidios, sino a partir de las hifas que se fragmentan (Maresca y Kobayashi, 1989). La conversión

puede obtenerse también mediante la inoculación en animales de experimentación susceptibles y en líneas celulares HeLa (Mitchell, 1983).

2.9.5. PRUEBA DE EXOANTÍGENOS. Esta prueba comienza a desarrollarse a partir de 1976 y ha demostrado ser altamente específica para la identificación de varias especies de hongos patógenos, entre ellos los agentes de micosis sistémicas: *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis* y *C. immitis* (Kaufman y Standard, 1978; Kaufman y Standard, 1987).

Mediante esta prueba se detectan antígenos solubles específicos elaborados por el hongo en los primeros estadios de su crecimiento y generalmente se aplica para la identificación de un cultivo desconocido sin la manipulación que conlleva su estudio morfológico, y por consiguiente evitando el riesgo de una infección accidental en el laboratorio (Kaufman, 1992; Ellis, 1994).

2.9.6. IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS. Recientemente se ha descrito la utilización de sondas de ADN (*Gen-Probe*) para la identificación de *H. capsulatum* con una sensibilidad y especificidad del 100 %. Los resultados pueden obtenerse en dos horas a partir de la fase miceliana o levaduriforme del hongo (Hove y Woods, 1997). Aunque existen algunas experiencias positivas en su aplicación en muestras clínicas, se requieren estudios más amplios que confirmen su valor práctico (Chemaly *et al.*, 2001; Lindsley *et al.*, 2001; Martagon-Villamil *et al.*, 2003; Bracca *et al.*, 2003). Sandhu *et al.* (1995) han empleado sondas radioactivas específicas (ARNr) para unas 20 especies de hongos, incluyendo a *H. capsulatum* y, aunque parece ser un método sensible y específico, todavía se encuentra en fase experimental. Bialek *et al.* (2002) han encontrado, en muestras de biopsias esplénicas de ratones infectados experimentalmente, una elevada sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en comparación con los métodos tintoriales convencionales. Es de esperar que en los próximos años se pueda disponer de sistemas comerciales que permitan la identificación rápida, directa y específica de *H. capsulatum* en muestras de pacientes (Warnock *et al.*, 1998; Reiss *et al.*, 2000; Bialek *et al.*, 2002; Riekerts *et al.*, 2002).

2.9.7. 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* (López-Martínez *et al.*, 1995).

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. La muestra de esputo debe descontaminarse previamente con antibióticos e inocularse en ratones (u otra especie animal susceptible). A las 2-4 semanas los animales se sacrifican y los hígados y bazo se maceran e inoculan en los medios de cultivo ya mencionados (Rippon, 1988).

2.9.8. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS. Las pruebas serológicas han sido de gran valor en el diagnóstico de la histoplasmosis, no sólo por su relativa rapidez en comparación con los métodos de cultivo e identificación, sino también porque, en muchas ocasiones, son la primera y a veces la única evidencia de infección (Elias Costa *et al.*, 2000; Wheat, 2003). Estas técnicas emplean como antígeno extractos obtenidos tanto de la fase filamentosa como de la levaduriforme de *H. capsulatum* (Negroni *et al.*, 1998); las más empleadas han sido la inmunodifusión doble, la fijación del complemento, la contrainmunolectroforesis y, más recientemente, algunos laboratorios han incorporado la técnica de ELISA indirecta (Bradsher, 1996; Hamilton, 1998; Negroni, 2001). De manera general, estas técnicas reúnen las siguientes condiciones:

- son sensibles.
- pueden aparecer falsos negativos en la infección temprana (en ocasiones demoran 4-6 semanas en ser detectados) y en pacientes inmunodeprimidos.
- pueden aparecer falsos positivos en otras micosis (paracoccidioidomicosis, blastomicosis y coccidioidomicosis).

- permanecen positivas durante años.

Según Wheat (2003) estas pruebas son positivas en aproximadamente el 71 % de las formas diseminadas de histoplasmosis, en el 100 % de las pulmonares crónicas y en el 95 % de las pulmonares agudas. Sin embargo, en individuos inmunocomprometidos la positividad es mucho menor. En casos de meningitis crónica por *H. capsulatum* también se han encontrado anticuerpos en LCR (Wheat *et al.*, 1990).

La prueba de fijación del complemento es más sensible que la inmunodifusión pero requiere de gran experiencia y habilidad por parte del personal del laboratorio. Si se pretende alcanzar una mayor sensibilidad se recomienda realizar simultáneamente ambas pruebas. Las pruebas de inmunoprecipitación son, sin embargo, más específicas; la aparición de bandas de precipitación **H** y **M** le confieren una alta especificidad. La presencia de una banda **M** indica una infección activa o pasada, o la aplicación reciente de una prueba intradérmica de histoplasmina; mientras que la banda **H** indica infección activa y casi siempre aparece acompañada de la banda **M** (García *et al.*, 1990). En un gel de agarosa, la banda **M** aparece más próxima al pocillo del antígeno mientras que, por el contrario, la banda **H** se sitúa más cercana al suero del paciente. Mediante la técnica de Western blot se ha podido precisar que a estas bandas de precipitación le corresponden pesos moleculares de 120 kDa y 94 kDa (H y M respectivamente) (Lacaz *et al.*, 1998).

Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) también han sido empleados en el diagnóstico de histoplasmosis, aunque de manera limitada, y han mostrado buena sensibilidad aunque menor especificidad que las pruebas de inmunoprecipitación (Elias Costa *et al.*, 2000). La interpretación de todas estas pruebas debe hacerse integrando sus resultados con los datos clínico-epidemiológicos y micológicos (Negroni, 1982; Bonifaz, 2000).

DETECCIÓN DE ANTÍGENO. En los últimos años se han desarrollado técnicas sensibles y específicas para la detección de un antígeno glicoprotéico de *H. capsulatum* en muestras de suero, LCR,

orina y lavados bronquioalveolares las cuales son de gran utilidad en el diagnóstico (Wheat *et al.*, 1986; Wheat, 2001).

Estas pruebas se consideran un avance en el diagnóstico y complementan las pruebas serológicas y micológicas (Wheat *et al.*, 2002). Mediante un radioinmunoensayo (RIA) y un ELISA de doble anticuerpos, se ha logrado detectar un antígeno específico en suero y orina de los pacientes con formas graves de histoplasmosis (Zimmerman *et al.*, 1989; Garringer *et al.*, 2000). Desde los primeros estadios de la enfermedad, este antígeno puede ser detectado, incluso antes de la aparición de los anticuerpos y los resultados pueden ser expresados cualitativa y cuantitativamente. Este constituye un método rápido para el diagnóstico de la enfermedad diseminada, con una buena sensibilidad y especificidad (sensibilidad en orina: 92 %; en suero: 82 %). Este antígeno se detecta menos frecuentemente en pacientes con la forma pulmonar aguda (44 %) y en la pulmonar crónica (21 %). En muestras de LCR también se ha detectado el antígeno en el 42-67 % de los pacientes que desarrollaron la forma meníngea (Wheat *et al.*, 1990) y en el 70 % de los lavados bronquiales de pacientes con SIDA que padecían una histoplasmosis pulmonar (Wheat *et al.*, 2002; Wheat, 2003).

Sin embargo, estas pruebas de detección de antígeno no sustituyen a las pruebas convencionales (detección de anticuerpos, examen directo y cultivo), sino que las complementan al mejorar la sensibilidad general del diagnóstico y aumentar su rapidez, particularmente en aquellos pacientes con las formas graves de la enfermedad. También ha sido de utilidad en el estudio de brotes epidémicos de histoplasmosis pulmonar aguda (Buxton *et al.*, 2002; Wheat *et al.*, 2002). Este método, aunque es específico para el antígeno glicoprotéico de *H. capsulatum* ha mostrado reactividad cruzada en muestras de orina de pacientes con otras micosis sistémicas (Wheat *et al.*, 1997; Hamilton 1998).

Las concentraciones de antígeno disminuyen en respuesta al tratamiento. En los pacientes con SIDA tratados con anfotericina B los niveles caen durante las primeras semanas de terapia y se

estabilizan a niveles bajos durante el tratamiento de sostén. En pacientes sin SIDA la eliminación del antígeno ocurre más rápida y completamente (Wheat *et al.*, 1992). La principal limitante de este método hasta el momento ha sido su no-disponibilidad internacional ya que sólo se realiza por el Laboratorio de Referencia de Histoplasmosis, en Indianápolis, dirigido por LJ Wheat (Dixon *et al.*, 1998; Wheat *et al.*, 2002; Wheat, 2003).

Más recientemente, se ha comprobado la utilidad de un sistema de ELISA de inhibición capaz de detectar un antígeno específico de *H. capsulatum* de 69-70 kDa, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal murino, con excelente sensibilidad y especificidad (Gómez *et al.*, 1999).

2.9.9. PRUEBA INTRADÉRMICA DE HISTOPLASMINA. Esta prueba permite evaluar la respuesta de hipersensibilidad mediada por células tipo IV (retardada). Consiste en la inoculación por vía intradérmica de 0,1 mL de histoplasmina (antígeno metabólico obtenido del filtrado de un cultivo en medio semisintético de la fase filamentosa de *H. capsulatum* previamente diluido y estandarizado) (Fava y Fava Netto, 1998). Después de la inoculación puede producirse de inmediato una pequeña reacción; sin embargo, de manera gradual se va desarrollando un área de induración y enrojecimiento que alcanza su máximo a las 48-72 horas, que es el momento de la lectura. Su positividad está dada por la formación de una zona de induración con un diámetro mayor de 5 mm. En algunos individuos, además del eritema, la reacción puede estar acompañada de prurito, vesiculación y necrosis en el punto de inoculación (Negroni, 1982). Se considera que esta prueba se hace positiva entre los 15 y 40 días siguientes al contacto con el agente causal. Su valor diagnóstico es limitado, ya que no discrimina entre infección pasada y reciente, sin embargo, ha sido una herramienta importante en el conocimiento de la epidemiología de la histoplasmosis ya que ha permitido delimitar las áreas endémicas (Zhao *et al.*, 2001; Bulmer y Bulmer, 2001). En las formas graves de la histoplasmosis la *negativización* de la intradermorreacción es índice de mal pronóstico (Rippon, 1988).

Uno de los inconvenientes que presenta la prueba de histoplasmina es que puede inducir la

formación de anticuerpos y, por consiguiente, falsear los resultados de las pruebas serológicas (Negroni, 1982). Su valor diagnóstico queda limitado a los siguientes casos: 1) en lactantes; 2) cuando tiene lugar un viraje de negativa a positiva y 3) cuando se detecta en personas que no han habitado anteriormente en áreas endémicas y no presentan reacciones positivas con otros antígenos fúngicos (Ribas-Forcadell *et al.*, 1998; Wolff, 1999).

Según algunos autores, puede existir cierto grado de reactividad cruzada entre la histoplasmina y otros antígenos fúngicos (paracoccidioidina, blastomicina, coccidioidina) (Naiff *et al.*, 1988; Van Gelderen de Komaid *et al.*, 1999). Sin embargo, la positividad a más de uno de estos antígenos puede estar determinada por la coexistencia de más de una especie fúngica en una misma área endémica (Silva-Vergara y Martínez, 1998; Fava y Fava Netto, 1998).

2.9.10. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* A LOS AGENTES ANTIFÚNGICOS. Como complemento del diagnóstico microbiológico, las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos han ido alcanzando cada vez más importancia en los laboratorios de Micología Médica ya que proporcionan datos confiables sobre el comportamiento de los hongos frente a las drogas empleadas en la terapéutica y por consiguiente, permiten una selección más racional del tratamiento (Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2002; Mellado *et al.*, 2002). Los estudios realizados con *H. capsulatum* han sido limitados, debido principalmente a las dificultades en la estandarización de la técnica; sin embargo, estas pruebas pueden ser de utilidad para la detección de cepas resistentes asociadas a fallos terapéuticos y en la evaluación de nuevos fármacos antimicóticos (Pfeller *et al.*, 1997; Perea y Patterson, 1999).

2.10. Principales drogas utilizadas en el tratamiento.

En las formas benignas de la enfermedad, en individuos inmunocompetentes, generalmente no es necesario el tratamiento antimicótico. Las opciones terapéuticas actuales incluyen ketoconazol, itraconazol, fluconazol y anfotericina B, esta última tanto en su forma convencional como en los recientes preparados liposomales, en suspensión coloidal y complejo lipídico de anfotericina B

(Wheat *et al.*, 2000).

La anfotericina B, con casi medio siglo de existencia, constituye el antimicótico de elección para el tratamiento de las formas severas y diseminadas de la histoplasmosis. De los compuestos azólicos, uno de los más utilizados ha sido el ketoconazol, y en los últimos años, en inmunocompetentes, el tratamiento con itraconazol como primera opción y anfotericina B como alternativa ha demostrado ser efectivo, tanto para las formas pulmonares como diseminadas (Wheat *et al.*, 1993). En inmunocomprometidos se recomienda como única opción la anfotericina B y continuar con dosis de mantenimiento de itraconazol (Bradsher, 1996). El fluconazol también está considerado como una alternativa importante en las infecciones del sistema nervioso central o en casos de intolerancia al itraconazol. Las terapias combinadas, que incluyen anfotericina B y uno de los azoles mencionados, han dado resultados halagüeños en diversas formas clínicas de esta micosis (Wheat *et al.*, 2000). Datos sobre estas drogas se muestran en el anexo 3.

En los últimos años se han comenzado a evaluar otros compuestos cuyos mecanismos de acción se basan en la inhibición de la síntesis de la pared celular (glucanos y quitina) de *H. capsulatum* (Milewski *et al.*, 1998; Kohler *et al.*, 2000; Maschmeyer *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2003), la mayoría de los cuales se encuentra en etapa pre-clínica. La caspofungina es el primer fármaco que se comercializa de una nueva clase de antifúngicos, las equinocandinas, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la β -1,3 glucano-sintetasa, responsable de la formación del β -1,3 glucano de la pared celular (Rodríguez- Tudela *et al.*, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de *H. capsulatum* de muestras ambientales.

Con el objetivo de detectar la presencia de *H. capsulatum* mediante su aislamiento, se estudiaron diferentes hábitats de murciélagos y aves distribuidos fundamentalmente en la región occidental del país, incluyendo la Isla de la Juventud.

3.1.1. Cuevas y otros hábitats:

CUEVAS: Se estudiaron un total de 51 cuevas localizadas en las provincias de Pinar del Río, La Habana, Matanzas, Granma y el municipio especial Isla de la Juventud, todas ellas con algún interés turístico, militar, ecológico o epidemiológico.

OTROS HÁBITATS: En la búsqueda de posibles fuentes de infección, también se estudiaron otros doce hábitats relacionados con aves y murciélagos en la Isla de la Juventud. La ubicación y nombre de las cuevas y otros hábitats estudiados aparecen en el anexo 4.

3.1.2. Métodos:

La metodología para la recolección y procesamiento de las muestras se realizó según Font D'Escoubet *et al.* (1975) y Taylor *et al.* (1994); la identificación se realizó según Rippon (1988) y Lacaz *et al.* (1998). La descripción de cada etapa se presenta en el anexo 5.

3.2. Aislamiento de *H. capsulatum* a partir de murciélagos.

Al estudiar zonas endémicas resulta imprescindible conocer la posible relación entre *H. capsulatum* y algunas especies animales, tanto domésticas como de la fauna silvestre. En este sentido, se realizó el siguiente estudio en murciélagos:

3.2.1. Materiales:

MURCIÉLAGOS: Se capturaron 230 murciélagos en las siguientes cuevas de la Isla de la Juventud: Cueva de Pedernales, Cueva de Cocodrilos, Cueva de La Higuera, Gruta Grande de Santa Isabel, Cueva del Agua y Cuevas N°. 2 y N°. 3 de Punta del Este. Posteriormente cada ejemplar

fue clasificado en género y especie según la clave de Silva Taboada (1979) para los murciélagos cubanos basada en caracteres morfológicos externos, para lo cual se contó con la colaboración del Grupo Espeleológico "Alejandro de Humbolt" de la Isla de la Juventud.

3.2.2. Métodos:

3.2.2.1. CAPTURA Y TRASLADO AL LABORATORIO: La captura de los murciélagos se realizó por dos métodos (DiSalvo *et al.*, 1970; Taylor *et al.*, 1994):

- empleo de redes colocadas a la entrada de las cuevas al atardecer o en el interior de las mismas.
- captura manual directa de los ejemplares en sus sitios de reposo en el interior de las cuevas.

Los primeros 180 ejemplares capturados se congelaron inmediatamente después de la captura a -10°C y se trasladaron al laboratorio, donde continuaron en congelación a -20°C hasta el momento de ser procesados (como máximo diez días) (Shacklette *et al.*, 1967; DiSalvo *et al.*, 1970). Otros 50 murciélagos fueron trasladados vivos al laboratorio en jaulas metálicas. Estos animales se sacrificaron por asfixia con vapores de eter etílico y procesados como se describe a continuación (McMurray y Russell, 1982). Como medida de protección, toda la manipulación de los ejemplares vivos se realizó con guantes de cuero.

3.2.2.2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS: De cada animal sacrificado (por congelación o por asfixia) se extrajeron hígado, bazo y pulmones, los cuales se maceraron asépticamente, por separado, con perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro) en morteros de porcelana. De cada macerado se sembraron 2 ó 3 asadas en paralelo en 2 tubos con agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y cicloheximida. La incubación de los tubos se realizó a 28°C por un período de hasta 8 semanas antes de considerarlos negativos.

3.2.2.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *H. CAPSULATUM*: Se realizó de la misma manera descrita en el anexo 5.

3.3. Identificación de *H. capsulatum* por la prueba de exoantígenos.

Se realizó el montaje de la técnica de exoantígenos para la identificación de *H. capsulatum* y su validación mediante la caracterización de un grupo de aislamientos de origen clínico y ambiental de la colección del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK y cepas de referencia como control.

3.3.1. Materiales:

CEPAS: Se estudiaron 43 cepas identificadas presuntivamente como *H. capsulatum* por métodos morfológicos (características culturales y microscópicas) (Rippon, 1988); 33 fueron aisladas del suelo de sitios habitados por murciélagos y aves de corral y dos a partir de órganos internos de murciélagos (*Artibeus jamaicensis parvipes*), según metodología descrita anteriormente; se estudiaron también ocho cepas de origen clínico humano (4 de esputos y 4 de hemocultivos) las cuales fueron obtenidas según procedimiento descrito por Balows y Hausler (1981). Las cepas controles utilizadas (anexo 6) estaban conservadas en agua destilada estéril a temperatura ambiente (28°C) en la micoteca del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.

3.3.2. Método: A todas las cepas se le realizaron las pruebas morfológicas de identificación (Rippon, 1988) y se confirmó su identidad mediante la comprobación de su dimorfismo *in vitro* (Koneman y Roberts, 1987).

3.3.2.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS: Las características culturales de las cepas se observaron tras incubación en agar Sabouraud glucosado a 28 °C, durante 10 días; la identificación microscópica se realizó mediante la observación de preparaciones con lactofenol azul de algodón (Rippon, 1988).

3.3.2.2. CONVERSIÓN A FASE LEVADURIFORME: Se realizó según Koneman y Roberts (1987) y se muestra en detalles en el anexo 7.

3.3.2.3. Prueba de exoantígenos:

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE EXOANTÍGENOS: Todas las cepas en estudio, así como los controles, se sembraron en tubos con agar Sabouraud glucosado y se incubaron a 28°C durante 15 días hasta obtener un crecimiento colonial de 25-30 mm de diámetro, al cabo de los cuales se cubrió con 10 mL de una solución acuosa de timerosal 1:5 000 y se mantuvo a 28°C durante 24 horas (Kaufman y Standard, 1978). El sobrenadante fue esterilizado con filtros de membrana de 0,22 µm. Este filtrado fue considerado el exoantígeno de cada cepa.

EVALUACIÓN DE LOS EXOANTÍGENOS: Los exoantígenos obtenidos de cada cepa se evaluaron mediante las técnicas de contrainmunolectroforesis e inmunodifusión doble en gel de agarosa, las cuales habían sido evaluadas previamente en el laboratorio. Para la inmunodifusión doble el exoantígeno se concentró 20X (polietilenglicol 6 000) y dializó en agua destilada (Kaufman y Standard, 1978). Como sueros controles en ambas técnicas se utilizaron inmunosueros de conejos preparados en nuestro laboratorio mediante un esquema de inoculaciones subcutáneas (infraescapular) semanales durante 10 semanas (dosis: 0,5 mL de antígeno metabólico de *H. capsulatum* en 0,5 mL de adyuvante de Freund) (Yarzabal, 1980). La presencia de bandas de identidad **H** y **M** o **H** sola se consideró como identificación definitiva de *H. capsulatum*.

3.4. Caracterización integral de los brotes epidémicos de histoplasmosis.

Se estudiaron cuatro brotes epidémicos de histoplasmosis relacionados con seis de las cuevas mencionadas anteriormente en la sección 3.1.1. Ante la sospecha clínico-epidemiológica de histoplasmosis se recibieron muestras clínicas de los pacientes involucrados para proceder al diagnóstico micológico en el Laboratorio de Micología del IPK. Para confirmar el origen de cada uno de los brotes, se realizaron los correspondientes estudios ambientales en las cuevas visitadas con el objetivo de aislar el agente etiológico. Estos brotes fueron los siguientes:

- BROTE 1.- Estuvo formado por 2 pacientes que se adentraron en una cueva de la Isla de la Juventud con el objetivo de recolectar garrapatas de murciélagos para estudios virológicos,

en julio de 1983.

- BROTE 2.- Formado por 11 pacientes que penetraron en una cueva del municipio Artemisa, con el objetivo de realizar excavaciones profundas, en mayo de 1991.
- BROTE 3.- Un grupo de 24 personas que enfermaron después de haber entrado y permanecido en, al menos, una de las tres cuevas, muy próximas entre sí, en el municipio de San José de las Lajas, en diciembre de 1998.
- BROTE 4.- Estuvo integrado por 59 personas hospitalizadas como consecuencia de haber permanecido durante varias horas realizando extensas remociones de tierra en el interior de una cueva en el municipio de Mariel, en diciembre de 1997.

3.4.1. Muestras clínicas y ambientales: A continuación se presenta el número de muestras procesadas para el aislamiento de *H. capsulatum* y determinación de anticuerpos en los cuatro brotes estudiados:

Brotes	No. de pacientes	No. de pacientes a los que se les tomó muestras de		No. de cuevas	No. de muestras ambientales
		Espitos	Sueros		
1	2	2	2	1	4
2	11	6	11	1	2
3	24	8	20	3	6
4	59	24	59 *	1	10

* A los pacientes del brote 4 se les tomó muestras en el momento del ingreso (50 pacientes), al mes (59 pacientes) y a los dos meses (53 pacientes).

ESPUTOS: Se tomaron de 1 a 5 muestras de cada paciente y se procesaron de acuerdo a la metodología establecida por Balows y Hausler (1981), la cual se describe en el anexo 8.

SUEROS: La determinación de anticuerpos anti-*H. capsulatum* se realizó mediante las técnicas de inmunodifusión doble, contrainmunolectroforesis (Cisneros Despaigne *et al.*, 1989) y un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, previamente estandarizado en nuestro laboratorio (Fernández Andreu *et al.*, 1992).

En las técnicas de inmunoprecipitación se utilizó como control un suero hiperinmune de conejo obtenido mediante inoculaciones subcutáneas según Yarzabal (1980). La aparición de bandas de identidad **M** y **H** en las pruebas de inmunoprecipitación se consideró como diagnóstico de histoplasmosis.

MUESTRAS AMBIENTALES : Ante la sospecha de histoplasmosis y conociendo el antecedente de permanencia en cuevas por parte de los enfermos, se realizaron visitas a éstas con el objetivo de tomar muestras ambientales (suelo) para el aislamiento de *H. capsulatum* y conocer las características de dichos hábitats. La toma de muestras se realizó en aquellos sitios del interior de las cuevas en que era apreciable la acumulación de guano; preferentemente se recogió el guano más viejo y mezclado con la tierra. El procesamiento de las muestras se efectuó como se describe en la sección **3.1.2.**

Se recogieron datos clínico-epidemiológicos a partir de las historias clínicas de los pacientes hospitalizados, así como también otros datos generales que permitieron caracterizar cada uno de los brotes. Por la cantidad de personas involucradas, se realizó un estudio más amplio del brote del Mariel a partir de los datos clínicos, epidemiológicos y micológicos.

3.5. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *H. capsulatum* frente a drogas antifúngicas.

Con el objetivo de conocer la sensibilidad *in vitro* de las cepas de *H. capsulatum* aisladas en nuestro medio, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol para cada una de las cepas.

3.5.1. Materiales.

CEPAS ESTUDIADAS.- 15 aislamientos clínicos y 14 ambientales de *H. capsulatum* pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Micología del IPK.

CEPAS DE REFERENCIA.- Como controles se emplearon las cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 recomendada en el documento M27-A del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (NCCLS M27-A, 1997) y *Paecilomyces variotii* ATCC 22319 (Espinel-Ingroff, 1998).

AGENTES ANTIFÚNGICOS.- Las drogas utilizadas fueron la anfotericina B (*Squibb*), el itraconazol (*Janssen*), el ketoconazol (*Janssen*) y el fluconazol (*Pfizer*).

SOLVENTES.- Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 % para el ketoconazol, el itraconazol y la anfotericina B; para el fluconazol se utilizó agua destilada estéril.

MEDIOS DE CULTIVO.- Los medios empleados fueron el agar papa dextrosa (APD) (*Oxoid*) para el cultivo de la fase filamentosa y el medio RPMI-1640 (*Sigma*) (en solución amortiguadora de ácido morfolinopropanosulfónico, MOPS, *Sigma*, 0,165 M, pH 7,0) para las pruebas de sensibilidad *in vitro*. Se utilizó además, el agar Sabouraud glucosado para la determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

SOPORTE.- Para la determinación de las CMI se emplearon placas estériles de poliestireno para microtitulación, de 96 pocillos con fondo cóncavo.

3.5.2. Método.

CEPAS.- Todos los aislamientos se cultivaron en fase filamentosa en medio APD y se incubaron a la temperatura de 28°C.

3.5.2.1. Pruebas de sensibilidad *in vitro*.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO: Se prepararon suspensiones de cada una de las cepas de *H. capsulatum* y de *P. variotii* a partir de cultivos de 7-10 días de incubación a 28°C en APD. La biomasa obtenida se cubrió con 5 mL de solución salina estéril y se desprendió con la ayuda de un asa de nicrom en espiral. Estas suspensiones fueron filtradas a través de gasa doble y posteriormenete se ajustaron espectrofotométricamente a una densidad óptica de 0,2 empleando una longitud de onda de 530 nm (Corning Colorimeter 253). De las suspensiones ya ajustadas, se tomaron 100 µL y se adicionaron a 5 mL de medio RPMI-1640 dispensados en tubos estériles para lograr el inóculo deseado. Se tomaron además, otros 100 µL de cada suspensión y se sembraron en placas de agar Sabouraud glucosado (100 x 15 mm) para la determinación de las UFC/mL (Espinel Ingroff, 1998).

En la cepa control *C. parapsilosis*, la suspensión se preparó a partir de un cultivo de 24 horas en agar Sabouraud glucosado a 28°C y se ajustó su turbidez en correspondencia con el tubo 0,5 de la escala de McFarland. Por último, se tomaron 50 µL de esta suspensión y se adicionaron a 5 mL de medio RPMI-1640, obteniéndose una concentración de $9,0 \times 10^3$ UFC/mL, lo cual se comprobó por conteo de colonias en agar Sabouraud glucosado (NCCLS M27-A, 1997).

DILUCIONES DEL ANTIFÚNGICO: La preparación de las diluciones de los antifúngicos se muestra en el anexo 9 (Fernández Andreu *et al.*, 1998).

INOCULACIÓN: La inoculación de las suspensiones de *H. capsulatum* en las placas se muestra en el anexo 10 (Fernández Andreu *et al.*, 1998). El esquema final de las placas utilizadas aparece en el anexo 11.

DETERMINACIÓN DEL PUNTO FINAL: Las placas se incubaron en cámara húmeda a 28°C. Las lecturas se realizaron cuando se detectó crecimiento visible en los pocillos correspondientes al control sin drogas con la ayuda de un visor de aumento. Para las drogas azólicas, la CMI se

consideró como la menor concentración de antifúngico que mostró una marcada inhibición del crecimiento ($\geq 50\%$) en comparación con el control sin droga, mientras que para la anfotericina B la CMI se definió como la menor concentración que fue capaz de producir un 100% de inhibición del crecimiento (Espinel-Ingroff, 1998).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se calcularon las medias geométricas de los valores de CMI de las cepas frente a cada una de las drogas, así como los rangos, los porcentajes acumulativos y las CMI₅₀ y CMI₉₀. Cuando la lectura de CMI fue superior a $64\text{ }\mu\text{g/mL}$, se tomó el valor de $128\text{ }\mu\text{g/mL}$ para el cálculo de la media geométrica. La comparación de las medias geométricas de las cepas de origen clínico y ambiental se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney.

La composición de las soluciones tampones y los medios de cultivo utilizados aparecen en el anexo 12. Todos los trabajos que se presentan en este documento fueron realizados en el Laboratorio de Micología del IPK.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras ambientales.

Como se observa en la tabla 1, *H. capsulatum* se aisló en 33 muestras obtenidas de sitios relacionados con murciélagos y aves. Después de la primera semana, y como promedio a los 10 días, comenzaron a observarse sobre la superficie del medio de cultivo pequeñas colonias de color blanco a crema, filamentosas, de crecimiento muy lento. Al microscopio se pudieron apreciar hifas hialinas, microconidios lisos, redondos y algunos piriformes y macroconidios que al principio eran de superficie lisa y aproximadamente a la segunda semana, en el 85 % de los aislamientos, ya se podía apreciar el aspecto tuberculado típico de los macroconidios de *H. capsulatum* (Rippon, 1988; Ellis, 1994; López Martínez *et al.*, 1995; Lacaz *et al.*, 1998). El hongo fue aislado de 30 cuevas, lo que representa el 58,8 % de las cuevas estudiadas (con un intervalo de confianza al 95 % de 45-72,6), y en la construcción abandonada en la Isla de la Juventud, así como en dos gallineros domésticos en la localidad de Cocodrilos también en la Isla de la Juventud.

En esa misma tabla se observa además, que en 25 muestras los exámenes microscópicos directos fueron positivos (75,7 %). La observación microscópica de muestras de suelos es un paso importante, pero no definitorio en la búsqueda de posibles fuentes de infección por *H. capsulatum*, ya que existen especies de hongos saprófitos de los géneros *Chrysosporium*, *Arthroderma* y *Sepedonium* cuya micromorfología es muy similar a la de *H. capsulatum* y pudieran confundirse (De Hoog y Guarro, 1995; López Martínez *et al.*, 1995; Lacaz *et al.*, 1998). En nueve de las muestras con exámenes directos positivos, (que sugerían la presencia de *H. capsulatum*) no se obtuvo crecimiento en los medios empleados, lo que hace suponer que se trataba de algunas de las especies saprófitas antes mencionadas o macroconidios no viables de *H. capsulatum*; por el contrario, aparecen ocho muestras (24,2 %) en que se obtuvo el cultivo y el examen directo fue negativo (tabla 1), lo que pudiera indicar una baja concentración de dichos conidios en las muestras; en estos últimos casos también hay que tener en cuenta la posible presencia de macroconidios lisos (no tuberculados), cuya observación microscópica *per se*, no permite la identificación de *H. capsulatum* (Lacaz *et al.*, 1998).

Tabla 1. Resultados del aislamiento e identificación de *Histoplasma capsulatum* a partir de muestras ambientales.

Origen de las muestras		Cultivo	Examen directo	Dimorfismo
Pinar del Río	Cueva del Espejo	+	-	+
	Cueva Oscura	+	+	+
	Cueva Los Taínos	+	+	+
	Cueva de Eulogio	+	+	+
La Habana	Peñón del Fraile (Jibacoa)	+	-	-
	Oceguera	+	+	+
	Mariel	+	+	+
	Cueva de los Murciélagos (BJ)	+	+	+
	Cueva del Majá	+	-	+
	Cinco Cuevas	+	+	+
	Cueva de la Virgen	+	+	+
	Cueva de los Murciélagos (SJ)	+	+	+
	Cueva de Candela	+	+	+
	Cueva del Indio	+	+	-
	Cueva Grande de Baracoa	+	+	+
	Cueva de Sandoval	+	+	-
Matanzas	Cueva de la Pluma	+	-	+
	Cueva de Calimete	+	-	+
Granma	Cueva de Bayazo	+	-	-
Isla de la Juventud	Cueva de la Lechuza	+	-	-
	Cueva del Abono	+	+	-
	Cueva de Cocodrilos	+	+	+
	Cueva de los Murciélagos	+	+	+
	Cueva de Cayama	+	+	-
	Gruta Grande de Santa Isabel	+	-	+
	Cueva de Carapachibey	+	+	-
	Cueva No. 1 Punta del Este	+	+	+
	Cueva No. 2 Punta del Este	+	+	+
	Cueva No. 3 Punta del Este	+	+	+
	Cueva No. 4 Punta del Este	+	+	+
	Gallinero doméstico I	+	+	-
	Gallinero doméstico II	+	+	-
	Construcción abandonada	+	+	+
Total		33	25	23

BJ: Boca de Jaruco; SJ: San José de las Lajas.

La conversión a la fase levaduriforme se logró en 23 (69,7 %) de las 33 cepas obtenidas. Se ha establecido que 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 esta especie (Mitchell, 1983; Fressatti *et al.*, 1992). En el proceso de transformación de micelio a levadura

juegan un papel importante los compuestos sulfhidrúlicos, especialmente la cisteína, la cual puede ser incorporada al 1% en los medios de cultivo (Maresca y Kobayashi, 1989).

Si bien se han reportado brotes de histoplasmosis relacionados con la exposición a troncos de árboles huecos (Castañeda *et al.*, 1983), en el presente estudio no se aisló *H. capsulatum* a partir del guano de murciélagos acumulado en el interior y los alrededores de los troncos de las “palmas barrigonas” (*Colpothrinax wrightii*), lo que pudiera deberse a la existencia de una rica entomofauna y acarofauna con posibles hábitos micófagos observada en este guano, las cuales pudieran afectar la viabilidad o supervivencia del hongo.

La presencia de *H. capsulatum* en gallineros es bien conocida en la literatura médica, aún antes de conocerse su relación con los murciélagos (Emmons *et al.*, 1977); sin embargo, en Cuba, anteriormente sólo se habían informado los aislamientos a partir de hábitats relacionados con estos quirópteros, por lo que este hallazgo, en gallineros domésticos en una misma localidad, adquiere importancia, desde el punto de vista epidemiológico, como posible fuente de microepidemias familiares (Zancopé Oliveira y Wanke, 1987; Chin, 1999). Al igual que ocurre con el guano de murciélagos, las deposiciones de estas aves proporcionan al suelo los nutrientes necesarios para que *H. capsulatum* pueda crecer y proliferar en ventaja con respecto a otros microorganismos de la microbiota (Lappe *et al.*, 1998). Al parecer, el hongo se desarrolla preferentemente sobre las excretas en descomposición, mezcladas con la tierra, más que en los nidos o en deposiciones frescas.

Las gallinas no son las únicas aves asociadas al hábitat natural de *H. capsulatum*; han sido frecuentes los aislamientos de este patógeno en sitios con acumulación de heces de palomas, estorninos, gaviotas, guácharos, golondrinas y aves ornamentales (Morse *et al.*, 1985; Contreras *et al.*, 1998; Chin, 1999). No obstante, estas relaciones ecológicas parecen ser mucho más complejas, ya que no siempre la existencia de las excretas de estos animales implica la presencia de *H. capsulatum* (Lappe *et al.*, 1998; Ulloa *et al.*, 1998). Aún en zonas de alta endemicidad, el

microorganismo sólo se encuentra en pequeñas áreas que coinciden muchas veces con un gran conglomerado de aves. En los EE.UU. ha sido demostrada la asociación de este hongo con las áreas que han ido poblando los estorninos (*Stornus vulgaris*) desde su introducción en ese país a fines del siglo XIX (Rippon, 1988). En Cuba, al igual que en otros países de América Central y del Sur, donde estas aves no han sido introducidas, la histoplasmosis se relaciona principalmente con los hábitats de gallinas y murciélagos (Howard, 1984; Van Gelderen de Komaid *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1994), aunque pudiera ser objeto de futuras investigaciones el estudio de la relación ecológica entre *H. capsulatum* y otras aves (palomas, gorriones, aves ornamentales o de corral, etc.).

Uno de los resultados de este estudio que más llama la atención ha sido el hallazgo de *H. capsulatum* en un espacio abierto y bajo la incidencia directa del sol, en una construcción abandonada, cuyas paredes de bloques servían de refugio a los murciélagos, sitio “improbable” según algunos autores que aseguran que este hongo debe buscarse en los lugares más internos y oscuros de las cuevas. Este hecho reviste gran importancia epidemiológica, ya que pudiera aclarar el origen de brotes epidémicos erróneamente asociados, en algunos casos, a cuevas o espacios cerrados y, en otros casos, de origen desconocido (Goodwin *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1997; Chin, 1999). Una posible explicación a la presencia del hongo en estos sitios fue planteada por Lappe *et al.* (1998), quienes aseguran que esta especie puede tolerar temperaturas extremas (-18°C y 40°C), si el contenido de humedad del suelo es adecuado. Resulta oportuno llamar la atención sobre el riesgo potencial que representa el uso de fertilizantes orgánicos (que pudieran contener guano de murciélagos o aves) en los huertos organopónicos urbanos o en plantas ornamentales (Meals y McKinney, 1998; Jiménez *et al.*, 2002).

Entre las cuevas donde se aisló *H. capsulatum* se encuentran algunas con interés turístico, como son:

- Las cuevas ubicadas en la base de campismo popular “Cueva de los Portales”, en el municipio La Palma, Pinar del Río. Estas cuevas se localizan dentro del área que ocupa la propia base de

campismo, son de fácil acceso y están entre las opciones recreativas que se brindan a los excursionistas. Algunas de ellas tienen también interés histórico.

- La cueva ubicada en la base de campismo “Peñón del Fraile” en el litoral norte habanero.
- Las cuevas de Punta del Este, de gran interés turístico, en la Isla de la Juventud, una zona declarada Monumento Nacional por el valor arqueológico y etnológico de las pictografías aborígenes encontradas en sus paredes y techos (Núñez Jiménez, 1980). A diferencia de las anteriores, estas cuevas se encuentran en una zona cuyo acceso para la población es limitado. También desde el punto de vista arqueológico resulta de interés la cueva de La Pluma, situada en las elevaciones calcáreas que se extienden en las desembocaduras de los ríos Bacunayagua y Yumurí, al norte de la provincia de Matanzas (Núñez Jiménez, 1990).

Otros hallazgos de gran importancia lo constituyen los aislamientos de *H. capsulatum* en cuevas de los municipios de Mariel y San José de la Lajas, en la provincia de La Habana, donde han tenido lugar brotes epidémicos de histoplasmosis relacionados con actividades de la defensa del país (sección 3.4).

Otras cuevas, quizás menos riesgosas, debido a su ubicación geográfica, son las cuevas del sur de la Isla de la Juventud donde también los cultivos de las muestras del suelo fueron positivos. Estas cuevas están ubicadas en zonas rurales que por su lejanía de los núcleos urbanos (exceptuando la de Cocodrilos), son muy poco frecuentadas por la población, razón por la cual probablemente no se hayan presentado brotes epidémicos hasta el momento.

Las cuevas habitadas por murciélagos son consideradas "espacios cerrados" donde las condiciones protegidas y relativamente estables de su interior permiten la proliferación de *H. capsulatum*. Su crecimiento se ve favorecido por la composición del guano de murciélagos y la disponibilidad de Ca^{2+} debido a la lixiviación de las rocas calcáreas (Lappe *et al.*, 1998). Sólo la actividad antropúrgica realizada en ese medio puede dar lugar a los brotes de histoplasmosis (Taylor *et al.*, 1997). Sin embargo, en los "espacios abiertos" (o sea, en exteriores), juega un

papel muy importante la desecación y la diseminación de las partículas infectantes (microconidios principalmente) por el viento (Rippon, 1988).

En 21 de las cuevas estudiadas no se aisló *H. capsulatum* a partir de las muestras procesadas; sin embargo, esto no descarta totalmente la presencia de este patógeno en dichas cuevas ya que según DiSalvo y Johnson (1979), la distribución de este hongo en el suelo no es homogénea, sino que se presenta en los llamados "microfocos", que son áreas muy limitadas y separadas entre sí, en las cuales este microorganismo encuentra las condiciones óptimas de temperatura, humedad y nutrientes para su desarrollo (Otcenášek *et al.*, 1967, Taylor *et al.*, 1994). Es por ello que resulta conveniente, al estudiar un determinado lugar, tomar muestras de varios sitios tratando de que éstos sean lo más representativo posible, teniendo en cuenta los recursos disponibles para el procesamiento de las muestras.

Este constituye el estudio más amplio de este tipo realizado en nuestro país y representa un aporte imprescindible al conocimiento de la endemidad de la histoplasmosis en Cuba.

4.2. Aislamiento de *H. capsulatum* de murciélagos.

En los estudios para delimitar posibles áreas endémicas, además de la búsqueda del agente causal en sustratos abióticos, resulta de gran utilidad realizar el aislamiento a partir de especies animales o vegetales que pudieran servir de hospederos o vectores. En el caso de la histoplasmosis, el grupo zoológico que más se ha asociado a ella ha sido el de los quirópteros.

En nuestro país se conocen 25 especies de murciélagos, algunas de las cuales se encuentran distribuidas por todo el territorio nacional, mientras otras tienen un hábitat más restringido (Silva Taboada, 1979). Como forma de ampliar y profundizar en el conocimiento de las características ecológicas de *H. capsulatum* en nuestro medio, se realizó su búsqueda en murciélagos capturados en el interior de las cuevas.

Como se observa en la tabla 2, de los 230 murciélagos capturados, el 49,5 % correspondía a *Artibeus jamaicensis parvipes*, que fue la especie más numerosa encontrada. Las restantes once especies se encontraron en frecuencias mucho menores.

Tabla 2. Total de murciélagos capturados distribuidos por especies.

Especies	Condiciones de traslado al Laboratorio		Total (%)
	Congelados	Vivos	
<i>Artibeus jamaicensis parvipes</i>	92	22	114 (49,5)
<i>Tadarida brasiliensis muscula</i>	12	8	20 (8,7)
<i>Phyllonycteris poeyii</i>	17	1	18 (7,8 %)
<i>Pteronotus parnelli parnelli</i>	17	0	17 (7,3)
<i>Brachyphylla nana nana</i>	0	16	16 (6,9)
<i>Pteronotus quadridens quadridens</i>	15	0	15 (6,5)
<i>Pteronotus macleayi macleayi</i>	15	0	15 (6,5)
<i>Natalus lepidus</i>	8	0	8 (3,4)
<i>Macrotus waterhousei minor</i>	0	3	3 (1,3)
<i>Eptesicus fuscus dutertreus</i>	2	0	2 (0,8)
<i>Mormoops blainvillei</i>	1	0	1 (0,4)
<i>Monophyllus redmani clinedaphus</i>	1	0	1 (0,4)
Total	180	50	230

H. capsulatum fue aislado en 12 de los 50 animales trasladados vivos al laboratorio (tabla 3). El tiempo máximo transcurrido entre la captura y el procesamiento de las muestras fue de 3 días. Los porcentajes de positividad por especies muestran los valores más altos en *Artibeus jamaicensis parvipes* (27,2 %) y *Tadarida brasiliensis muscula* (25 %), aunque el número de ejemplares de algunas especies fue pequeño. En dos ejemplares de la especie *A. jamaicensis parvipes* se recuperó el hongo a partir de los tres tipos de vísceras: pulmones, hígado y bazo. En 10 de los murciélagos se pudo aislar *H. capsulatum* de los pulmones, lo que representa el 83,4 % del total de murciélagos con cultivos positivos; esto indica que el pulmón representa una buena muestra

para la búsqueda de *H. capsulatum*. En los hígados y bazos los porcentajes fueron mucho menores, 33,3 y 41,6 %, respectivamente. El mayor porcentaje de aislamiento obtenido de los pulmones sugiere que, al igual que en el hombre, en estos animales la forma más frecuente de la histoplasmosis es la pulmonar (Greer y McMurray, 1981). Las muestras de pulmones fueron también las más contaminadas con hongos saprófitos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, los cuales por su mayor velocidad de crecimiento, limitan el desarrollo de *H. capsulatum* en los medios de cultivo, lo que pudo interferir en los resultados (De Hoog y Guarro, 1995; Lacaz *et al.*, 1998).

Tabla 3. Aislamientos de *Histoplasma capsulatum* obtenidos a partir de los órganos de los murciélagos trasladados vivos al laboratorio.

Especies (n)	Ejemplares con cultivo positivo (%)	P (%)	H (%)	B (%)
<i>Artibeus jamaicensis parvipes</i> (22)	6 (27,2)	6	2	2
<i>Brachyphylla nana nana</i> (16)	3 (18,7)	2	1	0
<i>Tadarida brasiliensis muscula</i> (8)	2 (25) a	2	0	2
<i>Macrotus waterhousei minor</i> (3)	1 (33,3) b	0	1	1
<i>Phylonycteris poeyii</i> (1)	0	0	0	0
Total (50)	12 (24,0)	10 (83,3)	4 (33,3)	5 (41,6)

P: pulmón; H: hígado; B: bazo

a: Primer reporte en Cuba; b: Primer reporte a nivel mundial.

En trabajos realizados por otros autores no se encuentra la misma frecuencia de aislamiento en los distintos órganos con respecto al total de murciélagos con cultivos positivos. Font D'Escoubet y Macola Olano (1976) aislaron *H. capsulatum* en hígado (75 %), pulmón (62,9 %) y bazo (31,2 %) de un total de 16 murciélagos. Por su parte, Chávez-Tapia *et al.* (1998) recuperaron el hongo a partir de pulmón (58,3 %), intestino (33,3 %) y bazo (8,3 %) en 12 murciélagos de dos estados mexicanos, mientras que Taylor *et al.* (1999) encontraron el hongo en muestras de pulmón (47

%), intestino (41,1 %), hígado (11,7 %) y bazo (5,8 %) de 17 murciélagos pertenecientes a seis especies diferentes a las reportados en el presente trabajo.

En estudios realizados por Shacklette *et al.* (1967), se obtuvo una alta positividad de aislamientos a partir de la mucosa y contenido intestinales, lo que confirma la capacidad de los quirópteros de eliminar células viables de *H. capsulatum* a través de sus heces y de esta forma contribuir a diseminar el hongo en el medio ambiente (Greer y McMurray, 1981; Lenhart, 1994). Aunque se ha sugerido que las lesiones de la mucosa intestinal son consecuencia de una diseminación gastrointestinal por vía hematógena a partir de un foco primario pulmonar, algunos autores no descartan la posibilidad de que se produzcan debido a la ingestión de partículas contaminadas con formas infectantes de *H. capsulatum* (Otcenásek *et al.*, 1967).

Por otra parte, la longitud del intestino de los quirópteros es muy inferior si se compara con la de otros mamíferos de similar peso y tamaño, lo que hace que el tránsito de *H. capsulatum* tenga lugar en un tiempo muy breve y sea mínima la afectación producida por las condiciones adversas de ese medio (colonización bacteriana masiva, presencia de inhibidores producidos por enterobacterias, potencial redox desfavorable, etc), por lo que la mayoría de las partículas fúngicas serían eliminadas al exterior completamente viables (Klite, 1965).

Otros autores han señalado una posible relación entre los hábitos alimentarios de los murciélagos y la histoplasmosis y, en particular, han sugerido la relación entre *H. capsulatum* y las especies insectívoras (Taylor *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1996; Chávez-Tapia *et al.*, 1998). Sin embargo, en nuestro estudio el mayor porcentaje de aislamiento se obtuvo en *A. jamaicensis*, también llamado "el murciélago frutero del Caribe" por ser una especie eminentemente frugívora y cuyos posibles hábitos insectívoros, hasta el presente, no han sido demostrados (Silva Taboada, 1979).

Mediante la observación del hongo en cortes histológicos, se ha demostrado que los murciélagos pueden desarrollar la enfermedad (Shacklette *et al.*, 1967; Goodwin *et al.*, 1981), así como también una respuesta inmune específica (McMurray y Russell, 1982).

El método de congelación empleado en 180 de los ejemplares capturados ha sido reportado por otros autores con resultados satisfactorios (Shacklette y Hasenclever, 1969; DiSalvo *et al.*, 1970). Sin embargo, en nuestro estudio no fue posible aislar *H. capsulatum* de ninguno de estos ejemplares, lo que pudo haber estado influido por las variaciones de la temperatura de congelación durante el traslado al laboratorio, lo que sin dudas debió afectar la viabilidad del hongo. Al respecto carecemos de otros trabajos anteriores que evalúen la influencia de las variaciones térmicas en la viabilidad del hongo para su aislamiento a partir de este reservorio.

En el presente trabajo todos los murciélagos fueron capturados en cuevas donde se había aislado el hongo a partir de muestras del suelo que contenían guano de murciélago. Además, se han informado casos de histoplasmosis en humanos, cuyas fuentes de infección comprobada han sido algunas de estas cuevas. Los ejemplares pertenecientes a la especie *A. jamaicensis parvipes* a partir de cuyos órganos se aisló *H. capsulatum* fueron capturados en la Cuevas de Cocodrilos y en la Cueva de los Murciélagos, de Punta Pedernales; *T. brasiliensis* y *B. nana nana* fueron capturados en las cuevas de Punta del Este y *M. waterhousei minor* fue encontrado en la Cueva de Cocodrilos, todas en la Isla de la Juventud.

Las diferentes especies de murciélagos tienen hábitos muy diversos y utilizan como refugio no sólo las cuevas, sino también los árboles, los techos de las casas y edificaciones abandonadas e incluso, las propias viviendas habitadas por el hombre (Chávez-Tapia *et al.*, 1998). Su asociación con la histoplasmosis no se limita, por lo tanto, a aquellas especies “rurales” o que viven preferentemente en cuevas, sino también a las de zonas urbanas donde estos quirópteros encuentran su refugio (Tamsitt y Valdivieso, 1970; Bartlett *et al.*, 1982).

El primer aislamiento de *H. capsulatum* a partir de murciélagos se realizó en Panamá en 1962; se trataba de un ejemplar de la especie *Pteronotus rubiginosa* (Shacklette *et al.*, 1967). Desde entonces, el hongo ha sido aislado de numerosas especies pertenecientes a diversos géneros (Diercks *et al.*, 1965; Font D'Escoubet y Macola Olano, 1976; McMurray y Russell, 1982; Taylor *et al.*, 1996; Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Vargas-Yáñez *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2000).

Este representa el primer reporte a nivel mundial de *H. capsulatum* en la especie *Macrotus waterhousei minor*. Asimismo, por primera vez se aísla en nuestro país este hongo en *Tadarida brasiliensis muscula*, especie con posibles hábitos migratorios, que ha sido reportada anteriormente en Arizona, EEUU, por DiSalvo *et al.* (1969). Font D'Escoubet y Macola Olano (1976) ya habían informado el aislamiento en las otras dos especies (*Brachyphylla nana nana* y *Artibeus jamaicensis parvipes*).

De las 25 especies de murciélagos descritas en Cuba, *H. capsulatum* había sido aislado en 4 de ellas (Font D'Escoubet y Macola Olano, 1976; Silva Taboada, 1979), cifra que asciende a 6 al incluir las encontradas en el presente trabajo. Algunos datos importantes sobre estas seis especies se presentan en el anexo 13.

Los murciélagos constituyen uno de los grupos de mamíferos de más amplia distribución en la naturaleza. En la actualidad se conocen más de 2 000 especies y subespecies de estos quirópteros cuyos hábitos alimentarios, costumbres, tamaño y hábitat son muy variados. Desde la antigüedad los murciélagos estuvieron asociados con supersticiones y creencias sobrenaturales; sin embargo, desde principios del siglo XX se comenzaron a considerar como animales útiles al hombre, ya que ayudaban a la polinización de los cultivos e intervenían en la dispersión de semillas de árboles de interés económico y además, su guano constituía un magnífico fertilizante para la agricultura (Tamsitt y Valdivieso, 1970).

Se ha llegado incluso a sugerir que algunas especies de estos mamíferos, grandes consumidores de insectos, fueran utilizados como control biológico en la erradicación de la malaria. En la actualidad, aunque se consideran excelentes controladores biológicos de plagas agrícolas y de mosquitos (Taylor *et al.*, 2000), los murciélagos ejercen un efecto negativo en la salud pública. En primer lugar, las especies hematófagas (vampiros) pueden atacar al ganado y en ocasiones al hombre. Además, se ha demostrado que constituyen importantes reservorios de los agentes etiológicos de algunas zoonosis y desempeñan un importante papel en la epidemiología de enfermedades tales como la rabia, algunas arbovirosis, malaria, filariasis y tripanosomiasis americana entre otras (Tamsitt y Valdivieso, 1970). En el caso particular de la histoplasmosis, los murciélagos desempeñan un doble papel: por una parte, a través de sus excretas proporcionan un sustrato muy rico para el crecimiento y desarrollo saprofítico de *H. capsulatum* en el suelo, y, por otro lado, debido a sus hábitos migratorios, constituyen un importante vehículo para la diseminación del hongo en la Naturaleza a través del uso temporal o permanente de diferentes refugios (Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Taylor y Reyes Montes, 2002; Constantine, 2003).

4.3. Identificación de *H. capsulatum* por la prueba de exoantígenos.

Una vez aisladas e identificadas las cepas de acuerdo a sus características morfológicas y su dimorfismo, se consideró útil la confirmación de su identificación mediante un método novedoso, conocido como *prueba de exoantígenos*, el cual ha demostrado tener una gran especificidad en la identificación de cultivos fúngicos (Kaufman y Standard, 1987; Rodríguez-Arellanes *et al.*, 1998).

En todas las cepas aisladas de pacientes y murciélagos se observaron al microscopio los típicos macroconidios tuberculados; sólo en cinco de las cepas aisladas del suelo no se encontraron dichas estructuras (tabla 4). Esto pudo deberse a la pérdida de la capacidad de producir los conidios por siembras sucesivas en el laboratorio o a errores en la identificación inicial de las cepas (Pedroso y Marcano, 1972), aunque también es conocido que existen cepas de *H. capsulatum* en las que estos macroconidios pueden estar ausentes o ser de paredes lisas (Lacaz *et al.*, 1998). El aspecto macroscópico de las colonias de estas cinco cepas así como su lento crecimiento y

resistencia a la cicloheximida fueron criterios básicos para su identificación preliminar, además de haber sido aisladas a través de la inoculación de ratones. Por otra parte, algunos hongos saprófitos de los géneros *Sepedonium*, *Arthroderma* y *Chrysosporium* entre otros, producen macroconidios tuberculados semejantes a los de *H. capsulatum*. Es por ello que, para la identificación de este patógeno no es posible basarse exclusivamente en criterios morfológicos. Las cepas de referencia utilizadas mostraron su micromorfología acorde con lo descrito en la literatura (Kaufman, 1992).

La conversión de las cepas a la fase levaduriforme se logró a las 4 semanas; al observarse macroscópicamente, las colonias tenían una apariencia pastosa y de color blanco-beige a blanco-gris; microscópicamente se encontraron en todos los casos una mezcla de pequeñas levaduras, algunas en gemación y fragmentos cortos de hifas. En 10 de las cepas aisladas del suelo no fue posible obtener las levaduras, lo que representa el 23 % del total de cepas en estudio (tabla 4). Diferentes autores han señalado lo difícil y a veces imposible que resulta la obtención de la fase levaduriforme de *H. capsulatum* por la lentitud del proceso y la frecuencia con que pueden contaminarse los medios de cultivo empleados (Fressatti *et al.*, 1992).

Tabla 4. Número de aislamientos identificados mediante los distintos criterios empleados.

Criterios de Identificación	Origen de las cepas (n)			Total (%)
	Humano (8)	Animal (2)	Suelo (33)	
Morfológicos ^(a)	8	2	28	38 (88,3)
Fisiológicos ^(b)	8	2	23	33 (76,7)
Inmunológicos ^(c)	8	2	32	42 (97,6)

n: número de cepas; (a) macroconidios tuberculados y caracteres culturales; (b): dimorfismo *in vitro*; (c): producción de exoantígenos

Los exoantígenos se definen como macromoléculas producidas por los hongos en los primeros estadios de su desarrollo. La prueba de exoantígenos se basa en la interacción entre esas macromoléculas (antígeno) elaborado por el hongo en cultivos y los anticuerpos homólogos, lo que

se pone de manifiesto mediante la formación de bandas de precipitación en las pruebas de inmunodifusión doble (IDD) y contraelectroforesis (CIE) y de esta forma queda establecida la identidad del hongo (Kaufman y Standard, 1987; Roberts y Goodman, 1993).

Se ha señalado que antes de los 10 días de cultivo no es posible detectar los exoantígenos de *H. capsulatum*. En el presente estudio se tomaron cultivos de 15 días y se obtuvieron resultados satisfactorios, lo que coincide con lo señalado por Body *et al.* (1988), quienes plantearon que a partir de la 2ª semana, en la mayoría de las cepas se pueden reconocer estos antígenos, permitiendo una identificación más temprana que por los métodos convencionales.

El 97,6 % de las cepas se identificó como *H. capsulatum* por la técnica de exoantígenos (tabla 4). Sólo una cepa no mostró ninguna de las bandas de identidad (**H** y **M**) en las pruebas de inmunoprecipitación frente al suero control; esta cepa tampoco pasó a levadura, por lo que se puede asumir que se trataba de alguna especie morfológicamente similar. La CIE mostró la misma sensibilidad que la IDD para revelar las bandas **H** y **M**; además, es más rápida, y en caso de la prueba de los exoantígenos, no requiere la concentración de éstos (Kaufman y Standard, 1978; Font D'Escoubet *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1996).

Las tres cepas de referencia de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, así como la cepa de *H. capsulatum* var. *duboisii* (*H. duboisii*) reaccionaron de manera específica con el suero control; en todos los casos se observaron las bandas **M** y **H** y se confirmó que poseen antígenos comunes y, hasta el presente, no pueden ser diferenciadas inmunológicamente por la técnica de exoantígenos (Kaufman y Standard, 1978). La histoplasmosis africana no ha sido descrita en Cuba ni en el hemisferio occidental, ni tampoco ha sido aislado su agente causal, *H. duboisii*, del medio ambiente, por lo que la identidad antigénica de estas dos variedades (*H. capsulatum* var. *capsulatum* y *H. capsulatum* var. *duboisii*) no debe constituir un problema diagnóstico para nuestro país en la actualidad. No obstante, resulta necesario destacar las novedosas e interesantes relaciones filogenéticas encontradas entre las tres variedades de *H. capsulatum* (*H. capsulatum*

var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* y *H. capsulatum* var. *farciminosum*), las cuales tendrán que tenerse en cuenta en futuros estudios taxonómicos (Kasuga *et al.*, 2003). Ninguna de las tres cepas de *P. brasiliensis* dio bandas de identidad con el suero control de histoplasmosis. Este resultado era de esperarse si se tiene en cuenta lo referido por Kaufman y Standard (1987), quienes no observaron reacciones cruzadas entre *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* en la prueba de exoantígenos a pesar de que ambas especies poseen determinantes antigénicos comunes.

Desde que comenzó su aplicación práctica, la prueba de exoantígenos ha ido ganando en aceptación hasta convertirse en una prueba confirmatoria para la identificación de diferentes especies, y muy particularmente para los hongos dimórficos causantes de micosis sistémicas, entre ellos *H. capsulatum* (López Martínez *et al.*, 1995; Lacaz *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999).

Además de sus aplicaciones en el diagnóstico, estas pruebas han alcanzado gran relevancia en estudios taxonómicos. En este sentido, la prueba ha permitido corroborar la agrupación de las tres variedades de *H. capsulatum* (*H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* y *H. capsulatum* var. *farciminosum*) en una sola especie, todas ellas capaces de producir los antígenos correspondientes a las bandas **M** y **H**, mientras que otros hongos cuya morfología es muy similar (*Chrysosporium* spp., *Sepedonium* spp.) no producen dichos antígenos (Kaufman y Standard, 1987; Lacaz *et al.*, 1998).

La prueba de exoantígenos además de su especificidad, tiene la ventaja de que puede identificar las formas típicas, las atípicas y las asporógenas de una especie determinada. Es mucho más rápida que los métodos convencionales de cultivo e identificación y tan específica como la conversión a levadura de *H. capsulatum*, reduce en gran medida el riesgo biológico que representa la manipulación de este patógeno y, sobre todo, repercute en el diagnóstico y tratamiento oportuno de la histoplasmosis (Kaufman y Standard, 1987; Warnock *et al.*, 1998). Tiene como limitante

que requiere la preparación previa de antisueros específicos, así como de reactivos controles. Además de su aplicación en la identificación de los hongos dimórficos, ha permitido identificar las especies de *Fusarium*, *Aspergillus*, dermatofitos y hongos dematiáceos, agentes de micosis humanas (Kaufman y Standard, 1987; Ellis, 1994; Sekhon *et al.*, 1995; Lacaz *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 1998).

La correcta identificación de *H. capsulatum* en los laboratorios de diagnóstico microbiológico del país es actualmente de gran importancia debido a la relativa frecuencia con que se sospecha la histoplasmosis, por lo que se hace necesario perfeccionar los métodos de identificación con técnicas cada vez más específicas, sensibles y rápidas. En la actualidad se considera una prueba confirmatoria, imprescindible en laboratorios de referencia, particularmente en áreas endémicas (Rodríguez-Arellanes *et al.*, 1998).

4.4. Caracterización de los brotes epidémicos de histoplasmosis relacionados con las cuevas estudiadas.

Los brotes epidémicos de histoplasmosis ocurridos en diversos países han estado relacionados con actividades humanas muy diversas como son: limpieza de locales abandonados, gallineros, palomares, tala de árboles, construcciones, recolección de guano, espeleología, turismo, arqueología, maniobras militares, minería, etc. Una exposición constante a cantidades abundantes de conidios en espacios cerrados puede resultar letal, mientras que las exposiciones moderadas provocan infecciones de gravedad variable, muchas de las cuales, en individuos inmunocompetentes, se resuelven en forma espontánea (Velasco-Castrejón y González-Ochoa, 1977; Taylor *et al.*, 1993; González-Zepeda *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999).

El presente estudio incluye cuatro de los brotes ocurridos, en los cuales el Laboratorio de Micología del IPK tuvo una participación directa en su identificación y caracterización mediante el diagnóstico micológico a partir de las muestras clínicas de los enfermos y posteriormente la

confirmación de la fuente de infección con el aislamiento del agente causal en las cuevas visitadas. Los resultados de los cuatro brotes se presentan a continuación:

BROTE 1.

Con el objetivo de realizar trabajos investigativos relacionados con la colecta de garrapatas de murciélagos para aislamientos virales, un grupo de tres personas penetró en el interior de la cueva, de ellas dos enfermaron. Debido a las características del trabajo a realizar, se examinaron minuciosamente las paredes y el suelo de la cueva durante aproximadamente 2 horas, lo que hizo que se provocaran aerosoles con partículas de polvo y guano que contenían conidios y fragmentos micelianos de *H. capsulatum*. Es conocido que la inhalación de conidios es la forma de adquirir la enfermedad y numerosos brotes de histoplasmosis pulmonar aguda como éste se han informado en la literatura mundial (Rippon, 1988; Chin, 1999; Bonifaz, 2000; Suárez *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 2003).

No fue posible el aislamiento de *H. capsulatum* a partir de las muestras de esputo de ninguno de los dos pacientes mediante la siembra directa en los medios de cultivo empleados. Sin embargo, la inoculación intraperitoneal de esputo en los ratones resultó ser un método satisfactorio para el aislamiento. Según se observa en la tabla 5, las tres primeras muestras de esputo del paciente A fueron insuficientes para su inoculación en ratones, por lo que sólo fueron inoculadas las muestras 4ª y 5ª; de ésta última se obtuvo *H. capsulatum* de un solo ratón (bazo).

En todas las muestras del paciente B se aisló el hongo. Es de gran importancia la obtención y procesamiento de muestras seriadas para una óptima recuperación del agente causal. De 21 ratones inoculados, se obtuvieron cultivos positivos en 13 de ellos. El tiempo que demoraron en aparecer las colonias fue de 10 a 15 días. En la observación microscópica de las muestras de esputo coloreadas con Giemsa, no se observaron levaduras de *H. capsulatum*. En los sueros de ambos pacientes fueron detectadas mediante CIE bandas de precipitación **H** y **M**, específicas de histoplasmosis activa.

Tabla 5. Aislamientos de *H. capsulatum* a partir de las muestras clínicas de los pacientes del brote 1 mediante la inoculación intraperitoneal de ratones.

Pacientes	Muestras de Esputo*					
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	Total
A	-	-	-	0/3	1/3	1/6
B	2/3	3/3	3/3	1/3	3/3	12/15
Total						13/21

* Ratones con cultivos positivos / Ratones inoculados

Aunque en los dos pacientes se desarrolló la forma pulmonar aguda, la evolución y severidad de los síntomas fue diferente en cada uno de ellos. En el primero, los síntomas (fiebre, tos, astenia y pérdida de peso) aparecieron a los 10 días de la exposición al agente causal, mientras que en el segundo aparecieron al cabo de las 6 semanas y fueron más marcados (tos, expectoración, astenia marcada, fiebre, anorexia y sudoración profusa) (tabla 6). Generalmente se ha planteado que el período de incubación oscila entre 10 y 16 días, aunque esto depende en gran medida del estado inmune del individuo, edad, tiempo y grado de exposición al agente, etc. También se ha observado que pueden presentarse períodos de incubación más cortos (3 a 5 días) y más largos, de alrededor de un mes (Torres-Rodríguez, 1991; Suárez *et al.*, 2002). No son frecuentes períodos de incubación tan largos como el del segundo paciente.

Tabla 6. Comparación de los brotes epidémicos de histoplasmosis estudiados.

Aspectos a comparar	Brote 1	Brote 2	Brote 3	Brote 4
Fuente de infección	Cueva	Cueva	Cueva	Túnel
Localidad	Punta del Este	Artemisa	San José	Mariel
Presencia de guano	Sí (escaso)	Sí (abundante)	Sí (moderado)	Sí (abundante)
Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> del suelo	Sí	Sí	Sí	Sí
Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> de murciélagos	Sí	NR	NR	NR
Actividad realizada	Recolección de garrapatas	Excavaciones profundas	Excavaciones	Excavaciones
Número de enfermos	2	11	24	59
Aislamiento de <i>H. capsulatum</i> de esputo	Sí	Sí	Sí	Sí
Exámenes serológicos positivos	CIE	IDD y ELISA	ELISA	ELISA
Exámenes radiológicos compatibles con histoplasmosis	Si	Si	Si	Si
Prueba de histoplasmina	Positiva	NR	NR	NR
Período de incubación (días)	10-45	10-15	18-20	10-20
Principales manifestaciones clínicas	Fiebre, tos, astenia, pérdida de peso, artralgia	Fiebre, tos, mialgia disnea, cefalea, pérdida de peso	Fiebre, tos, cefalea, pérdida de peso, astenia	Fiebre, tos, mialgia, artralgia, disnea
Tratamiento	Anfo B y Keto	Anfo B	Anfo B y Keto	Anfo B y Keto
Medidas de control	No	Sí	Si	Sí

NR: no se realizó; Anfo B: anfotericina B; Keto: ketoconazo

Una vez confirmado el diagnóstico en los dos pacientes, fue visitada la posible fuente de infección, conocida como la Cueva No. 3 de Punta del Este, en la Isla de la Juventud, la cual presenta una entrada ancha, que comunica a 4 abrigos rocosos o solapas, independientes unos de otros y que miden de 5 a 8 metros de profundidad (Núñez Jiménez, 1980). Está habitada por murciélagos de la especie *Tadarida brasiliensis muscula* y en el suelo puede apreciarse la acumulación de guano aunque en poca cantidad, lo que hacía suponer que la colonia de estos quirópteros no era numerosa. En el momento de la visita (mes de noviembre), la temperatura del interior de la cueva era de 28°C y la humedad relativa del 95 %.

De las 4 muestras del suelo de la cueva (2 de cada una de las dos primeras solapas), 3 fueron positivas (tabla 7). En una misma solapa se encontró una muestra positiva y otra negativa, recogidas a sólo 2 m de separación entre ellas, lo que viene a confirmar el concepto de los *microfocos*, aspecto que es muy importante en el estudio de la ecología de *H. capsulatum* (DiSalvo y Johnson, 1979; Taylor *et al.*, 1994). En la tabla 6 aparecen resumidos los datos de este brote.

Tabla 7. Diagnóstico de laboratorio. Resultados del procesamiento de muestras clínicas y ambientales de los cuatro brotes estudiados.

Brotes	No. de pacientes	Muestras de esputos * (%)	Muestras de sueros * (%)	No. de cuevas	Muestras del suelo * (%)
1	2	2/2 (100)	2/2 (100)	1	4/3 (75)
2	11	6/1 (16,6)	11/8 (72,7)	1	2/2 (100)
3	24	8/1 (12,5)	20/19 (95)	3	6/3 (50)
4	59	24/3 (12,5)	59/45 (76,2)	1	10/8 (80)

* Muestras procesadas/Muestras positivas

BROTE 2.

Al igual que otros brotes, éste tuvo lugar por la alteración del ambiente del interior de la cueva al realizar excavaciones profundas con el objetivo de buscar objetos de oro supuestamente enterrados. Esta cueva se encuentra ubicada en una zona rural cercana a la localidad de Ocegüera, en el municipio de Artemisa en la provincia de La Habana. La entrada de esta cueva consiste en un orificio de aproximadamente un metro de diámetro. Su acceso implicaba el empleo de medios auxiliares como cuerdas y escalas que permitieran el descenso (3-4 m de profundidad). El interior de la cueva estaba formado por un salón amplio y otros dos más pequeños. La colonia de murciélagos no era muy numerosa y sus sitios de reposo se encontraban en las partes más altas del techo.

Las 11 personas que visitaron la cueva enfermaron y 6 de ellas fueron hospitalizadas al presentar fiebre (38-40°C), dolores musculares, tos, disnea, cefalea y toma del estado general; en algunos, además, dolores articulares y pérdida de peso. Las imágenes radiológicas de tórax eran igualmente compatibles con la histoplasmosis pulmonar aguda. *H. capsulatum* fue aislado en el esputo de uno de los pacientes, aunque sólo en tres de ellos se recogió el número de muestras recomendado (3 a 5). Los estudios serológicos realizados permitieron confirmar el diagnóstico al encontrarse bandas **M** en la prueba de inmunodifusión doble con el suero de los seis pacientes hospitalizados. Mediante un sistema ELISA indirecto, ocho de los sueros fueron positivos (tabla 7).

El hongo fue aislado en las dos muestras de tierra del interior de la cueva, lo que confirmó la etiología del brote y permitió tomar la decisión de clausurar la cueva de forma tal que impidiera el paso de personas sin cerrar la entrada de los murciélagos. También fueron adoptadas medidas de tipo educativo divulgadas entre el personal médico y la población de la localidad. Los principales datos obtenidos a partir del estudio de este brote aparecen en la tabla 6.

BROTE 3.

Un grupo de aproximadamente 40 personas realizaron actividades relacionadas con la excavación

y remoción del suelo en tres cuevas ubicadas en una zona rural próxima al poblado de Zaragoza, en el municipio de San José de las Lajas, en la provincia de La Habana. Estas cuevas, conocidas como Cueva de los Murciélagos, Cueva del Yunque y Cueva de la Virgen, se encuentran próximas entre sí, son de fácil acceso y son visitadas por residentes de la zona.

El trabajo realizado requería la permanencia de estas personas en el interior de las cuevas varias horas al día, durante varios días. Estas cuevas estaban habitadas por murciélagos y se podía apreciar la presencia de guano en el suelo. A partir de los 12 días de haber estado expuestos por primera vez comienzan a aparecer los primeros síntomas, por lo que 24 personas del grupo tuvieron que ser hospitalizadas. Los principales síntomas y signos presentados fueron: fiebre, malestar general, tos, astenia, cefalea y dolor torácico. Los exámenes radiográficos de tórax evidenciaron lesiones compatibles con histoplasmosis en 20 de estos pacientes. Las pruebas serológicas (ELISA) fueron positivas en 19 muestras de sueros de 20 pacientes. Sólo se recibieron en el laboratorio los esputos de 8 pacientes (una muestra de cada paciente) y *H. capsulatum* fue aislado en una de ellas (tabla 7). Esto permitió confirmar la histoplasmosis en este paciente y al mismo tiempo, unido a los antecedentes clínico-epidemiológicos, constituyó una fuerte sospecha de que los demás también la tuvieran.

Los estudios ambientales realizados a partir de las muestras tomadas en el interior de las cuevas dieron como resultado el aislamiento de *H. capsulatum* en 2 muestras de la Cueva de los Murciélagos y en una de las muestras de la Cueva del Yunque. En la tabla 6 se muestran los principales datos relativos a este brote.

Estos resultados fueron informados a las autoridades locales de salud y fueron adoptadas las medidas necesarias para detener la actividad que se venía realizando en las mismas.

BROTE 4.

Este brote, el más grande de los estudiados por nuestro grupo de trabajo, se produjo por la

entrada en un túnel habitado por murciélagos con el objetivo de realizar diversas actividades que implicaban la remoción de la tierra y el guano acumulado con la consiguiente generación de abundantes aerosoles. Este túnel fue construido hace más de 30 años, y posteriormente fue abandonado y ocupado por una numerosa población de murciélagos. Se encuentra en una zona rural, alejada de los poblados más cercanos, en el municipio de Mariel en la provincia de La Habana. Su acceso resulta fácil ya que está situada a nivel del suelo, en la ladera de una colina o elevación.

Como resultado de ello fueron hospitalizadas 59 personas (de ellas 52 con síntomas y signos compatibles con histoplasmosis y otras 7 sin sintomatología), 57 eran hombres y sólo dos mujeres. Esta distribución en género ha sido la predominante en los brotes epidémicos ocurridos en nuestro país y se puede asegurar que el número de mujeres relacionadas con actividades en cuevas ha sido muy pequeño. La distribución por grupos de edades se muestra en la tabla 8, donde se puede apreciar que en la mayoría de los casos se trataba de adultos jóvenes. En cuanto al color de la piel, 39 pacientes eran blancos (66 %) y 20 eran negros (34 %). Algunos autores coinciden en señalar que las formas progresivas de la enfermedad parecen ser más frecuentes en la raza blanca que en la negra (Torres-Rodríguez, 1991; Bonifaz, 2000), aunque esto no está bien confirmado.

Tabla 8. Distribución por grupos de edades de los casos relacionados en el brote 4.

Grupos de edades	No. de casos	Porcentaje
15-24 años	6	10
25-34 años	16	27
35-44 años	19	32
45-54 años	11	19
55-64 años	7	12
Total	59	100

El grupo de personas implicadas permaneció en el interior de la cueva por un tiempo variable: como máximo 10 horas y como mínimo una hora (diariamente), lo cual se considera suficiente para que se produzca la infección; Wolff (1999) había reportado anteriormente un brote entre adolescentes en que el tiempo máximo de exposición fue de sólo 5-10 min, en Ecuador; Suárez *et al.* (2002) reportaron otro brote entre estudiantes que permanecieron en el interior de una cueva un tiempo máximo de 20 min, en Venezuela. También Weinberg *et al.*, (2003) informaron acerca de un brote de histoplasmosis aguda severa en un grupo de 14 personas después de haber permanecido aproximadamente 10 minutos en una cueva habitada por murciélagos en Nicaragua. En el presente brote, el tiempo de permanencia, aunque fue variable (figura 1), en algunos casos las personas permanecieron hasta 21 días realizando diferentes tipos de actividades en un ambiente cerrado, saturado de aerosoles y con una mínima circulación de aire, lo que indudablemente, favoreció la inhalación de las partículas infectantes (Torres-Rodríguez, 1991).

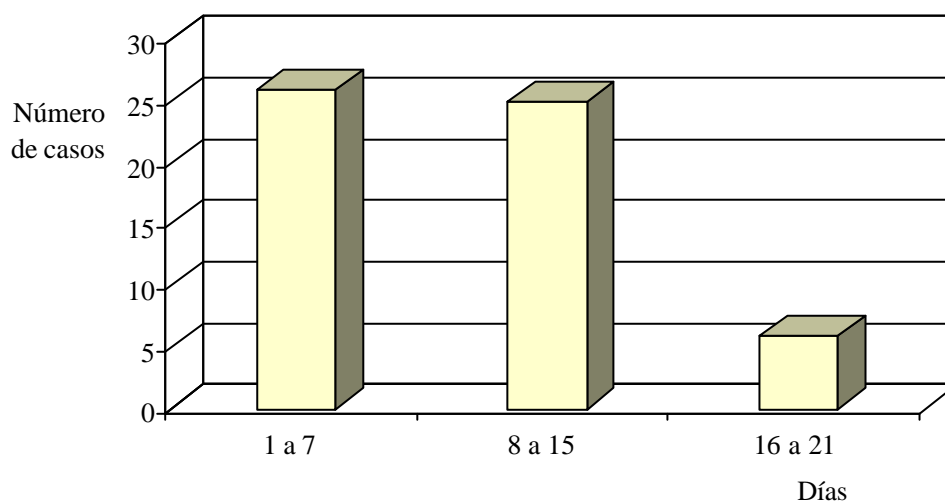


Figura 1. Tiempo de exposición (días de trabajo) en el interior de la cueva, brote 4.

De ese total de pacientes, en nuestro laboratorio fueron procesadas muestras de esputo de 24 de

ellos, ya que no todos presentaban expectoración. En tres de las muestras, pertenecientes a tres pacientes, fue aislado *H. capsulatum*, vía inoculación en ratones (tabla 7). Sólo de 6 pacientes se procesó más de una muestra de esputo, por lo que era de esperar la baja positividad obtenida en el estudio de este brote.

Las pruebas serológicas realizadas permitieron confirmar que se trataba de un brote epidémico de histoplasmosis (tabla 9). Estas pruebas han sido de gran importancia para el diagnóstico de la enfermedad, aunque un resultado negativo no la descarta completamente. En el momento del ingreso sólo el 10 % de los pacientes fueron positivos mediante ELISA, mientras que en la IDD no fue detectado ningún caso. Esto coincide con lo planteado por otros autores, quienes han señalado que antes de las 4 semanas es muy probable que no se detecten anticuerpos (Kaufman, 1992; Wheat, 2003). Como se observa en la tabla, la prueba de ELISA mostró ser más sensible que la IDD en los tres momentos en que fueron realizadas. Mediante una prueba de chi cuadrado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos a los 30 y a los 60 días por ninguna de las dos técnicas serológicas (IDD: $X^2 = 3,28$; $p = 0,07$; ELISA: $X^2 = 1,43$; $p = 0,23$) [Programa para ordenador EpiInfo, CDC, 2003].

Tabla 9. Resultados de las pruebas serológicas de los pacientes del brote 4.

Tiempo de realizada	No. de casos	IDD	ELISA
		Positivos (%)	Positivos (%)
Al ingreso	50	0 (0)	5 (10)
30 días	59	41 (69,4)	45 (76,2)
60 días	53	28 (52,8)	35 (66,0)
		$X^2 = 3,28$; $p = 0,07$	$X^2=1,43$; $p= 0,23$

La IDD es una prueba de alta especificidad ya que la presencia de bandas H y M es altamente

sugestiva de histoplasmosis. La posibilidad de falsos positivos es mínima ya que en nuestro país, hasta el momento, nunca han sido reportados casos de blastomicosis, coccidioidomicosis ni paracoccidioidomicosis, que son las principales causas de reacciones cruzadas (Kaufman, 1992).

En este estudio fue utilizada por primera vez en Cuba la técnica de ELISA para el diagnóstico de brotes epidémicos de histoplasmosis. Esta técnica ha permitido el procesamiento simultáneo de un mayor número de muestras, lo que unido a su mayor sensibilidad, rapidez y automatización de la lectura, hacen de ella una importante y útil herramienta diagnóstica cuando se combina adecuadamente con una correcta evaluación clínico-epidemiológica (Fernández Andreu *et al.*, 1992; Elias Costa *et al.*, 2000).

Al momento del ingreso el 100 % de los enfermos presentaba algún tipo de daño pulmonar, apreciable en las imágenes radiográficas de tórax, siendo los infiltrados miliares difusos las lesiones más frecuentes (63 %). Un mes después, estas lesiones se observaron en 47 pacientes (80 %), mientras que a los dos meses ya se había reducido a 35 enfermos (63 %).

Según la valoración de la evolución clínica de los pacientes, este brote se caracterizó por la elevada frecuencia de la forma pulmonar primaria grave (o severa) de la histoplasmosis (35 pacientes, 59 %), lo que puede haber estado relacionado con el prolongado tiempo de exposición, la formación masiva de aerosoles, la intensa actividad física realizada por la mayoría de los pacientes y la ausencia total de medidas de protección (Lenhart *et al.*, 1997; Bonifaz, 2000). Otros 17 pacientes (29 %) presentaron la forma pulmonar aguda benigna (o leve), la cual ha sido la manifestación clínica más frecuentemente observada en los brotes epidémicos de histoplasmosis (Lacaz *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1997; Suárez *et al.*, 2002). Siete pacientes presentaron la forma pulmonar asintomática, la cual sólo fue detectada por la radiografía de tórax y los antecedentes epidemiológicos.

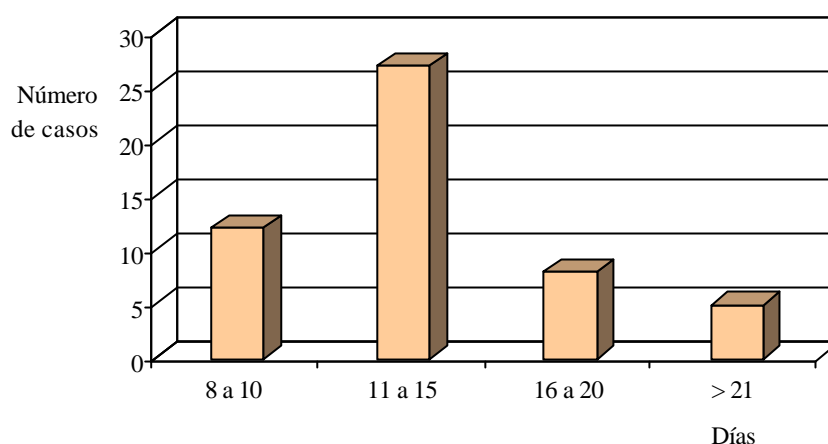


Figura 2. Período de incubación de los casos de histoplasmosis del brote 4.

Los primeros síntomas comenzaron a aparecer entre los 8 y 10 días (12 pacientes), mientras que entre los 11 y 15 días aparecieron en 27 pacientes (46 %) (figura 2), lo que coincide con la mayoría de los brotes que aparecen en la literatura médica (Chin, 1999; Wolff, 1999; Suárez *et al.*, 2002). Algunos autores han relacionado el período de incubación de la enfermedad con diversos factores como son la cuantía del inóculo, el tiempo de exposición y el estado inmunitario del paciente (Taylor *et al.*, 1997; Weinberg *et al.*, 2003).

Los principales síntomas presentados en el momento del ingreso se muestran en la figura 3. Los más frecuentes fueron fiebre (76 %), malestar general (69 %), tos seca (66 %), cefalea (59 %) y pérdida de peso (56 %), lo que coincide con la mayoría de los brotes epidémicos de histoplasmosis ocurridos en las principales zonas endémicas del mundo (Rippon, 1988; Lacaz *et al.*, 1991; Chin, 1999; Bonifaz, 2000).

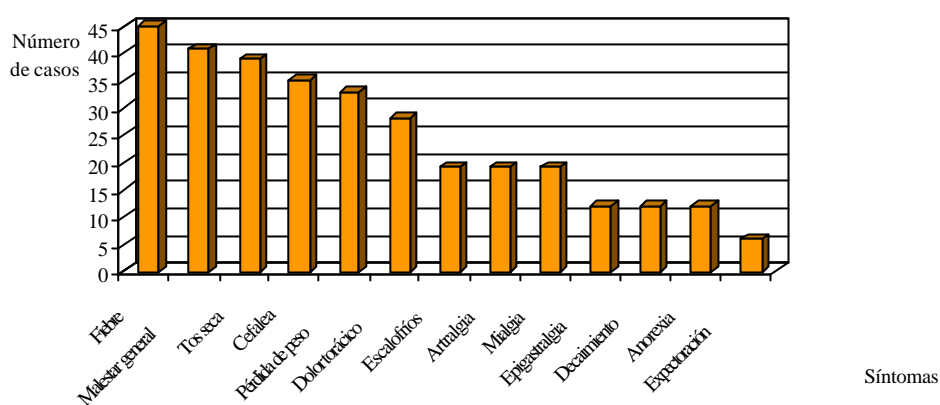


Figura 3. Principales síntomas encontrados entre los pacientes del brote 4.

En la figura 4 se muestran los signos relacionados con la enfermedad encontrados en el examen físico en el momento del ingreso; la elevada frecuencia de crepitantes (38 pacientes, 73 %) se corresponde con los hallazgos radiológicos de tórax en el 100 % de los pacientes. La hepatomegalia, observada en 24 pacientes (46 %), las adenopatías en 12 (23 %) y la esplenomegalia en 5 (10 %) también son signos encontrados con relativa frecuencia en varias formas clínicas de la enfermedad, especialmente en la histoplasmosis progresiva diseminada y en las formas pulmonares graves (Rippon, 1988; Torres-Rodríguez, 1991; Bonifaz, 2000).

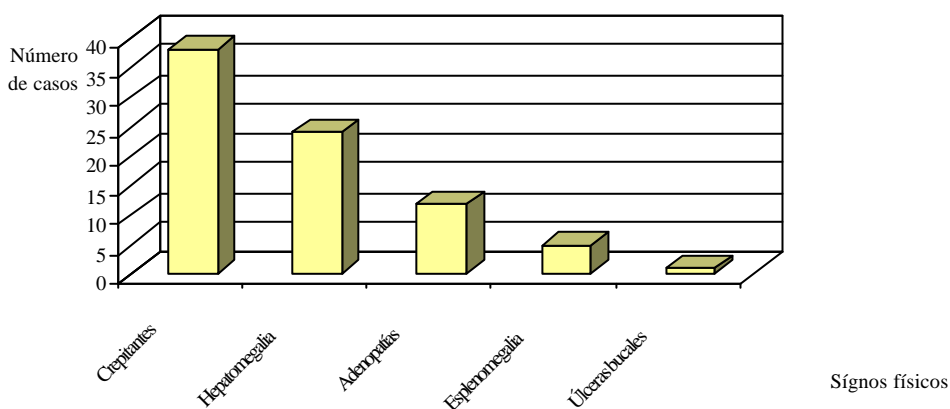


Figura 4. Signos más frecuentemente encontrados en los pacientes del brote 4.

Al igual que en los brotes anteriores, fue confirmada la fuente de infección mediante el aislamiento de *H. capsulatum* en 8 muestras de tierra (tabla 7). Los exámenes microscópicos realizados con lactofenol azul de algodón mostraron también la presencia de macroconidios tuberculados (De Hoog y Guarro, 1995; Lacaz *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2002).

Al presentarse e identificarse integralmente este brote epidémico de histoplasmosis, se decidió detener el trabajo que se realizaba en el túnel hasta que fuera valorada por las autoridades competentes la probable descontaminación química del lugar.

Los datos comparativos de los cuatro brotes estudiados se presentan resumidos en la tabla 6. Los brotes epidémicos de histoplasmosis reportados en la literatura médica han tenido en común la realización de actividades que conllevan la remoción del suelo o la alteración de determinados sitios relacionados con aves o murciélagos (Chin, 1999; Bonifaz, 2000; Pecanha Martins *et al.*, 2000). Entre estas actividades, las más frecuentes son: la limpieza de locales cerrados o abiertos, próximos a corrales o refugios de aves o murciélagos, la tala de árboles, las construcciones, la recogida de guano de murciélagos y su utilización como fertilizante en la agricultura y jardinería, la espeleología, la arqueología, la minería, las exploraciones con fines turísticos, recreativos o científicos, entre otras (Ashmeade-Dyer *et al.*, 1979; Lottenberg *et al.*, 1979; Taylor *et al.*, 1996; Lenhart *et al.*, 1997; González-Zepeda *et al.*, 1998; Ashford *et al.*, 1999; Erkens *et al.*, 2002; Buxton *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2002). Sin embargo, no siempre ha sido posible el aislamiento del agente causal, aún en aquellos brotes donde la fuente de infección parece evidente (Schlech *et al.*, 1983).

Este tipo de estudio muestra cómo a través de la actividad coordinada entre las autoridades locales de salud y el IPK, se pudieron estudiar los brotes de histoplasmosis y precisar la fuente de infección y de esta forma controlar la aparición de nuevos brotes y dar respuesta a problemas de salud que pudieron haber tenido implicaciones sociales y económicas de mayor alcance en las respectivas localidades.

El estudio de estos brotes epidémicos ha permitido a nuestro laboratorio establecer una metodología para su caracterización y control, la cual puede ser aplicada en el estudio de futuros brotes y que comprende los siguientes aspectos:

1. Estudios clínico-epidemiológicos:

- Valoración clínico-epidemiológica. Definición de caso.
- Exámenes complementarios (hemograma, radiografía de tórax, ultrasonido abdominal).

2. Estudios de laboratorio:

- Exámenes histopatológicos.
- Examen microscópico directo de los productos patológicos.
- Cultivo de los productos patológicos.
- Inoculación en animales de experimentación.
- Aislamiento e identificación de *H. capsulatum*: características culturales, micromorfología, dimorfismo, prueba de exoantígenos.
- Determinación de la drogosensibilidad.
- Pruebas serológicas: inmunodifusión doble, ELISA.
- Prueba intradérmica de histoplasmina (cuando se considere necesaria).

3. Estudios ambientales:

- Visita a la posible fuente de infección.
- Toma de muestras ambientales y exámenes micológicos.
- Captura de murciélagos u otras especies animales de la zona.
- Exámenes micológicos y serológicos de los animales capturados.

4. Medidas de control:

- Valorar, según cada caso, medidas de tipo mecánico, físico, químico o algún tipo de control biológico.

5. Medidas divulgativas:

- Dirigidas al personal médico y paramédico, a la población de riesgo, a la población general y residentes en la zona.
- Capacitación del personal profesional y técnico de los laboratorios de la Red Nacional de Microbiología del MINSAP.

6. Medidas preventivas

Debido a la endemidad que parece tener la histoplasmosis en Cuba, es importante que las autoridades competentes conozcan cuáles son las cuevas contaminadas en cada región con el objetivo de poder tomar las medidas preventivas necesarias para evitar la aparición de casos aislados o brotes epidémicos entre el personal que por determinadas razones tenga que adentrarse en ellas.

Una característica común en estos cuatro brotes epidémicos ha sido la intromisión del hombre en hábitats contaminados sin la utilización de medios de protección. La actividad física, unido al enrarecimiento del aire en el interior de estos "espacios cerrados", conllevan un incremento de la frecuencia respiratoria y por consiguiente, se hace mayor la probabilidad de inhalar aerosoles contaminados con las partículas infectantes del hongo. En algunos casos la medida más efectiva tomada, ha sido la clausura de la cueva o la colocación de avisos consignando el riesgo que representa el acceso a la cueva (Rippon, 1988). Igualmente, se hace necesario divulgar las medidas de bioseguridad entre el personal de salud y visitantes habituales de hábitats contaminados, así como la población en general (González-Zepeda *et al.*, 1998). Como una de las principales medidas, debe reducirse al mínimo la exposición a un medio contaminado conocido (gallineros, cuevas u otros hábitats de murciélagos y aves) (Lenhart *et al.*, 1997; Chin, 1999). Otras medidas para prevenir la infección por *H. capsulatum* entre aquellas personas que prefieran las cuevas como una opción turística y las que tengan que realizar trabajos de campo, son:

- a) evitar la formación de aerosoles rociando con agua el suelo y las paredes
- b) usar máscaras protectoras

- c) seleccionar los individuos aptos para la exploración de locales cerrados
- d) entrar sólo en pequeños grupos y
- e) realizar pequeños muestreos previos para la búsqueda del hongo en determinados lugares propuestos para algún tipo de trabajo de campo u otra actividad humana y sólo iniciar las labores cuando se corrobore la ausencia de riesgo.

(Fernández Llanes *et al.*, 1987; Lenhart *et al.*, 1997; González-Zepeda *et al.*, 1998; Wolff, 1999; Erkens *et al.*, 2002).

Para la descontaminación de focos conocidos se ha utilizado la aspersión de diferentes desinfectantes y fungicidas y otras sustancias que eviten la dispersión del hongo en el ambiente; la más utilizada ha sido la formalina al 3 %, que logra eliminar el hongo al menos de manera temporal (Tamsitt y Valdivieso, 1970; Morse *et al.*, 1985; Carmona Fonseca, 1995; Lenhart *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2002). Sin embargo, este tratamiento puede resultar potencialmente carcinogénico para el hombre y, además, afectar considerablemente la fauna y la flora del lugar, por lo que debe ser aplicado después de un detallado estudio ecológico y la expresa autorización de las instituciones encargadas de la protección ambiental (Chin, 1999; Ashford *et al.*, 1999).

Los reportes cada vez más frecuentes de brotes epidémicos de histoplasmosis permiten sugerir una amplia presencia de su agente etiológico en determinados nichos ecológicos que pueden estar distribuidos en todas las provincias del país.

4.5. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *H. capsulatum* frente a drogas antifúngicas.

La estandarización del inóculo constituye el primer paso crítico en las pruebas de sensibilidad *in vitro* con agentes antifúngicos (Galgiani *et al.*, 1992). En el presente trabajo, al realizar las lecturas de las UFC de cada una de las cepas, a los 7 días de incubación a 28°C, se pudo determinar que las concentraciones de los inóculos obtenidos a partir de la fase filamentosa oscilaron entre $1,1 \times 10^4$ y $6,6 \times 10^4$ UFC/mL, valores semejantes a los empleados por Espinel-Ingroff ($0,9-4,7 \times 10^4$

UFC/mL) en un estudio similar donde compara la actividad *in vitro* del voriconazol con la anfotericina B y el itraconazol, mientras que Nakai *et al.* (2003) emplean inóculos entre 10^4 y 10^5 células/mL al comparar las dos fases de crecimiento de *H. capsulatum* frente a diferentes antifúngicos. En particular, cuando se trata de hongos filamentosos, este paso se hace mucho más difícil debido a que la suspensión celular generalmente está formada por fragmentos de hifas de diferentes tamaños y por los distintos tipos de conidios (Espinel-Ingroff, 1998; Nakai *et al.*, 2003).

Las drogas utilizadas tienen su principal sitio de acción sobre el ergosterol de la membrana fúngica, el cual presenta pocas variaciones en la transición de micelio a levadura, proceso en el que los cambios fundamentales se registran en la composición de α y β -glucanos de la pared celular (San Blas y San Blas, 1983; Kumar y Maresca, 1988; San Blas, 1992; Eissenberg *et al.*, 1997; Nakai *et al.*, 2003).

A escala mundial se han reportado pocos trabajos relacionados con la sensibilidad *in vitro* de los hongos filamentosos o dimórficos, fundamentalmente por la falta de estandarización en los métodos empleados (Espinel-Ingroff, 1998; Perea y Patterson, 1999). Para *H. capsulatum*, por su naturaleza dimórfica, el problema de la estandarización del inóculo es mayor, ya que los valores de CMI pudieran ser distintos para la fase miceliana y la levaduriforme. En este caso, algunos autores recomiendan preparar la suspensión de células a partir de la fase levaduriforme, lo cual proporcionaría un inóculo más homogéneo. Sin embargo, las levaduras de *H. capsulatum* son mucho más difíciles de cultivar en el laboratorio que las formas filamentosas; las primeras requieren no sólo una temperatura de 37 °C sino también medios de cultivo enriquecidos y complejos, los cuales no son recomendados para el estudio de la sensibilidad *in vitro* (Galgiani *et al.*, 1992; Espinel-Ingroff *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 2003).

Los resultados de los valores de CMI, para las cepas de origen ambiental y de origen clínico, así como los rangos y medias geométricas para cada una de las drogas se determinaron a los 7 días

de incubación y se muestran en las tablas 10 y 11 respectivamente. Para el total de cepas, se observó una inhibición total del crecimiento en presencia de itraconazol, con un valor de CMI de 0,125 µg/mL. En las cepas de origen ambiental, los valores de CMI de anfotericina B y ketoconazol estuvieron en un rango de 0,125-0,5 µg/mL, mientras que el fluconazol presentó las mayores diferencias, con un rango de valores de CMI de 32->64 µg/mL. Para las cepas de origen clínico, los valores obtenidos, en general, fueron muy similares: el rango de CMI de anfotericina B fue de 0,125-1,0 µg/mL, mientras que el de ketoconazol fue de 0,125-0,25 µg/mL. El fluconazol mostró igualmente los valores más altos de CMI y rango de 16->64 µg/mL. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las medias geométricas de los valores de CMI entre los dos grupos de cepas para ninguna de las cuatro drogas. Sin embargo, sería conveniente profundizar en este aspecto en estudios posteriores con un mayor número de aislamientos. De manera gráfica, el comportamiento del total de cepas frente a las cuatro drogas se muestra en la figura 5.

Analizando la totalidad de las cepas, para la anfotericina B se encontró que con 0,25 µg/mL se podía inhibir más del 50 % de las mismas (CMI₅₀), mientras que la siguiente dilución (0,5 µg/mL) fue capaz de eliminar al 93 % (CMI₉₀) (tabla 12). Esta es la droga más efectiva *in vivo* y continúa siendo el antimicótico de elección para el tratamiento de las micosis sistémicas, asociadas o no con el VIH (Wheat *et al.*, 2000; Dismukes, 2000; Gilbert *et al.*, 2001; Mensa-Pueyo *et al.*, 2002; Wheat, 2004).

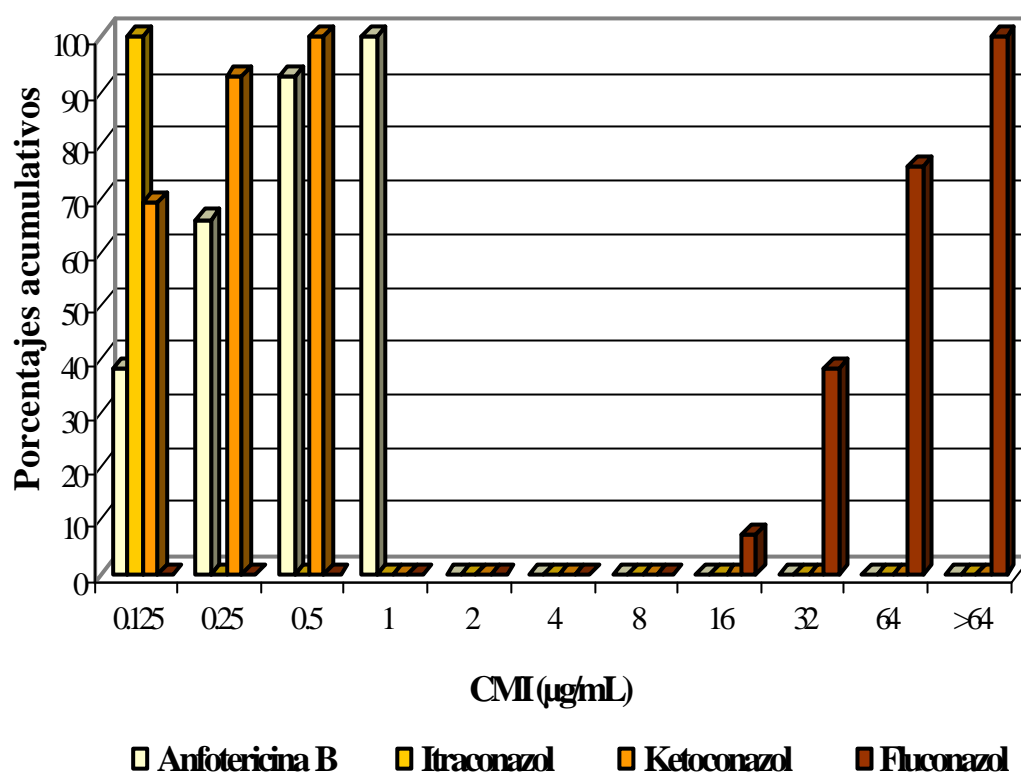


Figura 5. Distribución de los porcentajes acumulativos de los valores de CMI de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol de las cepas estudiadas.

Los resultados *in vitro* también confirman la alta eficacia de la anfotericina B, en particular frente a *H. capsulatum*. En este caso, para el total de cepas, se obtuvo un rango de CMI y una media geométrica de 0,125-1,0 µg/mL y 0,26 µg/mL, respectivamente, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos por Espinel-Ingroff (1998) en un estudio similar, donde encontró un rango de 0,25-0,5 µg/mL y una media geométrica de 0,42 µg/mL, partiendo de la fase filamentosa. Valores similares (0,05-1,0 µg/mL) fueron encontrados por Shadomy y Pfaller en 1991; Connolly *et al.* (1999) por su parte, obtuvieron valores más bajos, con un rango de 0,25-1,0 µg/mL y una media geométrica 0,5 µg/mL. Más recientemente, Nakai *et al.* (2003) obtuvieron un rango de 0,0625-0,125 µg/mL partiendo también de la fase filamentosa.

Tabla 10. Valores de concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol en las cepas de *Histoplasma capsulatum* de origen ambiental.

Cepas	Anfotericina B	Itraconazol	Ketoconazol	Fluconazol
001	0,25	0,125	0,125	>64
002	0,5	0,125	0,125	32
003	0,25	0,125	0,125	32
006	0,25	0,125	0,125	64
011	0,5	0,125	0,125	64
0262	0,125	0,125	0,5	64
0263	0,5	0,125	0,125	64
0264	0,125	0,125	0,25	32
0265	0,125	0,125	0,5	>64
0266	0,25	0,125	0,25	32
0268	0,25	0,125	0,125	32
0269	0,25	0,125	0,25	64
0270	0,125	0,125	0,125	64
0271	0,25	0,125	0,125	64
Rango	0,125-0,5	0,125	0,125-0,5	32->64
Media Geométrica	0,24	0,125	0,18	55,2

Tabla 11. Valores de concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol en las cepas de *Histoplasma capsulatum* de origen clínico.

Cepas	Anfotericina B	Itraconazol	Ketoconazol	Fluconazol
004	0,5	0,125	0,125	>64
007	0,5	0,125	0,125	32
013	1,0	0,125	0,125	64
051	1,0	0,125	0,125	32
071	0,5	0,125	0,25	>64
074	0,125	0,125	0,25	32
079	0,125	0,125	0,25	>64
080	0,125	0,125	0,25	>64
081	0,5	0,125	0,125	64
0140	0,25	0,125	0,125	64
0173	0,125	0,125	0,125	16
0174	0,125	0,125	0,125	32
0261	0,5	0,125	0,125	16
0267	0,125	0,125	0,125	64
0272	0,125	0,125	0,125	>64
Rango	0,125-1,0	0,125	0,125-0,25	16->64
Media Geométrica	0,27	0,125	0,15	55,7

Polak y Dixon (1987) y Kobayashi *et al.* (1990) al estudiar la sensibilidad de diferentes cepas de *H. capsulatum* en fase levaduriforme frente a la anfotericina B, encontraron rangos de CMI de

0,07-0,15 $\mu\text{g/mL}$ y de 0,3-1,04 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, los cuales se pueden considerar bastante cercanos a los obtenidos en el presente trabajo.

Como ya se mencionó anteriormente, todas las cepas estudiadas fueron inhibidas con 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de itraconazol, por lo que en este caso, este valor coincide con la CMI_{50} y la CMI_{90} (tabla 12). Estos resultados se corresponden con los informados por Espinel-Ingroff (1998) quien reporta una media geométrica de CMI de 0,06 $\mu\text{g/mL}$, que representa sólo una dilución inferior de CMI con respecto al obtenido en el presente trabajo. Otros autores han encontrado valores homogéneos de CMI y media geométrica de 0,019 $\mu\text{g/mL}$, los cuales son inclusive ligeramente inferiores en comparación con los nuestros para la fase filamentosa (Connolly *et al.*, 1999). Nakai *et al.* (2003) reportaron un rango entre 0,0156 y 0,0313 $\mu\text{g/mL}$, también inferior a los valores obtenidos en el presente trabajo. Todo esto sugiere el empleo, en estudios futuros, de concentraciones más bajas de esta droga con vistas a determinar con mayor exactitud el valor de CMI.

El itraconazol es más activo frente a *H. capsulatum* que los otros compuestos azólicos, ya que además del blanco principal de éstos (la enzima 14- α -demetilasa del lanosterol, dependiente del citocromo P450) tiene acción inhibitoria sobre la 3-ketosterol reductasa (Vanden Bossche *et al.*, 1998). Esta droga ofrece una alternativa efectiva para el tratamiento de pacientes con manifestaciones de histoplasmosis ligeras o moderadamente severas y para la complementación de la terapia en aquellos que hayan evolucionado después de un tratamiento corto con anfotericina B (Kauffman y Carver, 1997; Connolly *et al.*, 1999; Wheat, 2004; Corti *et al.*, 2004). Por su alta efectividad *in vitro* y los resultados obtenidos en el tratamiento de la histoplasmosis, algunos autores lo consideran el fármaco de elección en pacientes con SIDA (Gilbert *et al.*, 2001; Mensa-Pueyo *et al.*, 2002; Wheat *et al.*, 2002).

Tabla 12. Número de cepas inhibidas y sus porcentajes acumulativos frente a las concentraciones de los antifúngicos utilizados.

Concentración (µg/mL)	Anfotericina B		Itraconazol		Ketoconazol		Fluconazol	
	n (%)	PA	n (%)	PA	n (%)	PA	n (%)	PA
0,125	11 (38)	38	29 (100)	100	20 (69)	69	-	-
0,25	8 (26)	66	-	-	7 (24)	93	-	-
0,5	8 (26)	93	-	-	2 (7)	100	-	-
1	2 (7)	100	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	2 (7)	7
32	-	-	-	-	-	-	9 (31)	38
64	-	-	-	-	-	-	11 (38)	76
>64	-	-	-	-	-	-	7 (24)	100
MG	0,26		0,125		0,16		55,4	
Rango	0,125-1,0		0,125		0,125-0,5		16->64	
CMI ₅₀	0,25		0,125		0,125		64	
CMI ₉₀	0,5		0,125		0,25		>64	

n: Número de cepas; PA: Porcentajes acumulativos

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron una marcada inhibición de *H. capsulatum* frente al ketoconazol, con un rango de CMI entre 0,125-0,5 µg/mL y una media geométrica de 0,16 µg/mL (tabla 12). El 69 % del total de cepas resultó inhibido por la menor

concentración de la droga, lo cual representa un valor de CMI₅₀ de 0,125 µg/mL, mientras que el 93 % mostró inhibición con la dilución siguiente, correspondiéndose con una CMI₉₀ de 0,25 µg/mL. También Shadomy *et al.* (1985) habían obtenido valores bajos de CMI, con una media geométrica entre 0,07 y 0,12 µg/mL, con una CMI₉₀ de 0,1-0,2 µg/mL al comparar la sensibilidad *in vitro* de *H. capsulatum* (fase filamentosa) en tres medios de cultivo diferentes. Al comparar estos resultados con los de Heel (1982) y los de Polak y Dixon (1987) a partir de la fase levaduriforme, se observa que el rango encontrado por Heel estuvo entre 0,1-0,5 µg/mL, mientras que los segundos obtuvieron un rango entre 0,03-0,07 µg/mL. En ambos casos los resultados demuestran una alta efectividad *in vitro* del ketoconazol, lo que se corresponde en gran medida, con lo obtenido por nosotros, aunque con valores ligeramente superiores.

El ketoconazol fue el primer antifúngico imidazólico disponible por vía oral, y se convirtió en una alternativa importante para el tratamiento de la histoplasmosis en pacientes inmunocompetentes. Sin embargo, éste no debe ser utilizado en la enfermedad diseminada progresiva o en pacientes infectados por el VIH con histoplasmosis diseminada, debido a que la respuesta al tratamiento es más lenta y no es tan efectivo como la anfotericina B o el itraconazol (Kauffman y Carver, 1997; Wheat *et al.*, 2000).

La elevada disponibilidad oral y los reducidos efectos adversos del fluconazol, entre otros, son factores que han contribuido a su amplia utilización en el tratamiento de numerosas infecciones fúngicas (Kauffman y Craver, 1997; Dismukes, 2000). En el caso de la histoplasmosis, un tratamiento con dosis elevadas de fluconazol induce la remisión en la mayoría de los pacientes (Mignogna *et al.*, 2001), sin embargo, muchos presentan episodios de recurrencia frente a la terapia sostenida con esta droga (Wheat *et al.*, 1997). En este sentido existen ciertas contradicciones ya que algunos autores como George y Penn (1993) afirman categóricamente que el fluconazol no debe usarse en el tratamiento de la histoplasmosis. Sin embargo, Bradsher (1996), Negroni (2001), Wheat *et al.* (2000), Mensa-Pueyo *et al.* (2002), Saccente *et al.* (2003) y Corti *et al.* (2004) han planteado que este fármaco pudiera ser adecuado en pacientes que no toleren el

itraconazol y en infecciones del sistema nervioso central por *H. capsulatum*.

La pobre efectividad del fluconazol frente a la histoplasmosis parece ser un reflejo de su reducida actividad *in vitro* frente a *H. capsulatum* (Wheat *et al.*, 1997). En el presente estudio se obtuvo un rango de CMI entre 16- >64 µg/mL, con media geométrica de 55,4 µg/mL (tabla 12), lo cual se corresponde con lo expuesto anteriormente. En trabajos realizados por Polak y Dixon (1987) frente a la fase levaduriforme, los valores de CMI se encontraron en un rango de 0,25-5,0 µg/mL, con una media geométrica de 3,3 µg/mL, mientras que Kobayashi *et al.* (1990) obtienen valores mucho más elevados, que oscilan entre 2,95 y 1000 µg/mL. Otros autores han encontrado valores entre 4 y 16 µg/mL para la fase filamentosa (Nakai *et al.*, 2003). Wheat *et al.*, (2001) reportaron la emergencia de resistencia al fluconazol como causa de fallo terapéutico en pacientes inmunodeprimidos, cuyas cepas de *H. capsulatum* mostraron valores de CMI ≥ 5 µg/mL. Estos resultados sugieren la necesidad de elevadas concentraciones de fluconazol *in vitro* para lograr la inhibición de *H. capsulatum*, lo cual coincide con lo obtenido en el presente trabajo, donde los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron de 64 y >64 µg/mL respectivamente. Sin embargo, también se puede observar que existe una gran variabilidad entre las cepas de *H. capsulatum* frente al fluconazol en los diferentes estudios realizados, por lo que sería conveniente continuar profundizando en el estudio de los factores que influyen en este comportamiento.

Las cepas de *C. parapsilosis* y *P. variottii* utilizadas como control de calidad mostraron valores de CMI que se correspondieron con los de referencia (NCCLS M27-A, 1997; Espinel-Ingroff, 1998), lo que nos sirvió para validar la actividad de los antifúngicos empleados (tabla 13).

Tabla 13. Comparación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de anfotericina B, itraconazol, ketoconazol y fluconazol de las cepas controles empleadas en el presente trabajo con los valores de referencia.

Cepas	Antifúngicos	Rango de CMI (µg/mL)	
		Estudio Actual	Referencia
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	Anfotericina B	0,5-2	0,25-1 ^a
	Itraconazol	0,125-0,25	0,06-0,25 ^a
	Ketoconazol	0,125-0,25	0,06-0,25 ^a
	Fluconazol	2-4	2-8 ^a
<i>Paecilomyces variotii</i> ATCC 22319	Anfotericina B	0,125-0,25	0,03-1 ^b
	Itraconazol	0,125-0,25	0,25-1 ^b
	Ketoconazol	0,125-0,5	ND
	Fluconazol	4-16	ND

a: NCCLS M27 A, 1997; b: Espinel-Ingroff, 1998; ND: Datos no disponibles

Teniendo en cuenta la comparación de los resultados obtenidos para las cuatro drogas a partir de la fase filamentosa de *H. capsulatum*, con los encontrados por otros autores que parten de la fase levaduriforme, es importante señalar que estos últimos no difieren en gran medida de los nuestros. Este es un aspecto interesante y que debe tenerse en cuenta en los futuros trabajos relacionados con las pruebas de sensibilidad *in vitro* con hongos dimórficos. El presente trabajo ha permitido determinar, por primera vez en Cuba, la sensibilidad de cepas autóctonas, tanto ambientales como de origen clínico de *H. capsulatum* frente a los cuatro agentes antifúngicos más utilizados en la terapéutica de la histoplasmosis.

DISCUSIÓN GENERAL

La histoplasmosis es una de las cuatro grandes micosis endémicas del continente americano y, según algunos autores es la micosis sistémica de más amplia distribución mundial (Velasco-Castrejón y González Ochoa, 1977; Taylor *et al.*, 1997; González-Zepeda *et al.*, 1998). Desde 1987, se ha incluido entre las micosis oportunistas que definen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Johnson y Sarosi, 1994), de ahí el renovado interés que ha adquirido su estudio en los últimos años.

Para determinar la endemidad de una enfermedad infecciosa en una región cualquiera, resulta imprescindible realizar estudios que permitan conocer el hábitat natural de su agente causal y sus posibles reservorios, vectores y hospederos. Los estudios que en este sentido se han llevado a cabo en nuestro país sobre la histoplasmosis, comenzaron en 1974 con el primer aislamiento de *H. capsulatum* a partir de muestras de tierra de una cueva relacionada con un brote epidémico en la provincia de La Habana (Chang Puga y Font D'Escoubet, 1974). Nuestro clima, las características del suelo y el subsuelo y, en general, las condiciones ecológicas son las adecuadas para el desarrollo saprófito de *H. capsulatum*, no solamente en cuevas de murciélagos, sino también en otros hábitats.

En el presente estudio *H. capsulatum* fue aislado en 30 de las 51 cuevas estudiadas, lo que representa el 58,8 % y constituye el estudio más amplio de este tipo realizado en Cuba. El hallazgo de este hongo en gallineros domésticos y en espacios abiertos relacionados con murciélagos debe servir de alerta sobre aspectos de la ecología de *H. capsulatum* nunca antes informados en el país y cuyo valor epidemiológico es evidente.

Entre las especies animales son, sin dudas, los murciélagos los más relacionados con la histoplasmosis y su agente causal. En revisiones realizadas de la literatura internacional especializada no se encontraron reportes anteriores sobre el aislamiento de *H. capsulatum* en la especie *Macrotus waterhousei minor*. Los datos acumulados hasta hoy permiten asegurar que los murciélagos, en general, desempeñan un papel decisivo en el mantenimiento de *H. capsulatum*

en el medio ambiente ya que proporcionan al suelo los nutrientes necesarios para su desarrollo. Por sus hábitos alimentarios y migratorios son capaces de diseminar el hongo a través de sus excretas, creando así nuevos focos, a veces insospechados de histoplasmosis. De esta forma, su papel en la epidemiología de esta micosis resulta incuestionable (Greer y McMurray, 1981; Lenhart, 1994; Taylor *et al.*, 1997; González-Zepeda *et al.*, 1998; Chavez-Tapia *et al.*, 1998). La existencia de histoplasmosis animal en Cuba es un elemento más que permite apoyar la hipótesis acerca de la endemidad de esta micosis en el país.

Los resultados del presente trabajo, relacionados con los aislamientos de *H. capsulatum* de fuentes ambientales, se encuentran entre los primeros que se realizan en los respectivos territorios y fueron hechos a solicitud de las autoridades de salud o de los gobiernos locales así como también de diferentes instancias del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), Ministerio de las Fuerzas Armadas Revolucionarias (MINFAR), Ministerio de Turismo (MINTUR), Órganos Locales de Poder Popular y la Dirección Nacional de Campesinismo Popular, lo que reafirma la importancia social que tiene para el país el conocimiento de esta micosis.

En Cuba las cuevas han sido utilizadas con diversos fines, ya sean turísticos, científicos, económicos, militares u otros. Muchas de las cuevas del presente estudio tienen gran importancia por sus potencialidades en el desarrollo turístico, en particular en las modalidades conocidas como *ecoturismo*, *espeleoturismo* o *turismo de aventura*. Es conveniente que las autoridades locales conozcan cuáles son los sitios contaminados con *H. capsulatum* y en especial las cuevas, para poder tomar las medidas preventivas necesarias.

El hecho de que la histoplasmosis sea causada por un hongo cuyo hábitat natural sea el suelo con deyecciones de animales, plantea un problema difícil de controlar (Lenhart *et al.*, 1997), pero que sin dudas deberá enfrentarse de manera integral por las diferentes instituciones involucradas (Ministerio de Salud Pública, Ministerio de las Fuerzas Armadas Revolucionarias, Ministerio de Turismo, Ministerio del Trabajo y Seguridad Social, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio

Ambiente, etc.) ya que gran parte de nuestra población está expuesta, al menos ocasionalmente, a las fuentes de infección como resultado de actividades productivas, turísticas, recreativas, científicas o militares.

Según la literatura médica revisada (Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996) y los datos de nuestro laboratorio, unos 49 casos clínicos de histoplasmosis han sido descritos en Cuba, sin incluir los informados como brotes epidémicos. Las edades de los pacientes han oscilado entre 3 y 66 años y aunque no se observa un predominio marcado de un determinado grupo de edades, la enfermedad parece ser poco frecuente entre los menores de 10 años (anexo 14). Al observar la distribución por sexos, se destaca una relación hombre:mujer de 9:1. Los pacientes de la raza blanca representaron el 97 %, aunque no siempre este dato pudo ser obtenido.

Las principales manifestaciones clínicas y la base del diagnóstico se muestran en el anexo 15, donde se observa que las formas pulmonares representaron el 32,6 % de los casos. En el 48 % de las formas diseminadas el diagnóstico estuvo basado en el aislamiento de *H. capsulatum*, mientras que en las formas pulmonares el cultivo de las muestras patológicas brindó poca ayuda diagnóstica. La identificación de las cepas aisladas se ha basado principalmente en sus características morfológicas, en la conversión a la fase levaduriforme y en la prueba de exoantígenos. Esta última no se considera una prueba presuntiva, sino una evidencia definitiva, de alta especificidad, sensibilidad y rapidez y cuyo riesgo biológico es mínimo cuando se compara con los métodos convencionales de identificación (López Martínez *et al.*, 1995; Lacaz *et al.*, 1998). Se considera una técnica indispensable en laboratorios de referencia de áreas endémicas.

El diagnóstico histopatológico ha constituido una herramienta muy útil en el 88 % de las formas diseminadas y en particular en todos los casos de histoplasmosis asociados al SIDA (Capó de Paz *et al.*, 1990; Millán Marcelo *et al.*, 1990; Rodríguez Barreras *et al.*, 1992; Fernández Andreu *et al.*, 1996; Arteaga Hernández *et al.*, 1998). Sin embargo, no siempre es posible obtener una

muestra patológica adecuada debido a los métodos agresivos que en ocasiones se requieren, lo que constituye una limitación si se compara con los métodos micológicos.

Las pruebas serológicas se consideran de gran valor en el diagnóstico de la histoplasmosis. En los casos señalados en el anexo 15, éstas fueron positivas en el 62 % (Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996); sin embargo, en los pacientes con SIDA la positividad fue solo del 25 %, lo que está en concordancia con el conocido deterioro general que sufre el sistema inmunológico de estos pacientes. En los últimos años una de las técnicas más utilizadas ha sido la técnica de ELISA, la cual, desde que fue incorporada de manera rutinaria al diagnóstico serológico de la histoplasmosis en nuestro laboratorio y por primera vez en el país, ha contribuido a garantizar una buena sensibilidad y especificidad cuando se realiza junto con la IDD y ha sido la herramienta principal, desde el punto de vista serológico para el diagnóstico de numerosos brotes epidémicos de histoplasmosis debido a las posibilidades de procesamiento de gran número de muestras, rapidez y de lectura automatizada (Taylor *et al.*, 1996).

En nuestro país, en la actualidad, el diagnóstico serológico de la histoplasmosis no se realiza aún en todas las provincias; en este sentido el Laboratorio de Micología del IPK, como Laboratorio Nacional de Referencia ha tenido entre sus funciones la elaboración de antígenos y antisueros para el montaje de las técnicas de serodiagnóstico y su extensión a todo el país, así como la formación del personal técnico y profesional que deberá asumir estas tareas, al menos en los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología.

Es necesario resaltar la necesidad de que se garanticen las debidas medidas de bioseguridad ya que el trabajo en los laboratorios de Micología en general, y de Micología Médica en particular, se considera también una ocupación de riesgo (Lenhart *et al.* 1997). No son excepcionales los casos reportados de histoplasmosis adquirida en el laboratorio, ya sea a través de agujas contaminadas o por aerosoles (DiSalvo, 1987; Torres-Rodríguez, 1991). Aunque según la Resolución No. 42/99 del CITMA *H. capsulatum* está considerado un patógeno de riesgo 2, a nivel internacional está

incluido entre los de riesgo 3, por lo que debe manipularse en condiciones de laboratorio con la máxima protección al operador y al medio ambiente (De Hoog, 1996; Padhye *et al.*, 1998).

Desde 1965, en que se dan a conocer los primeros brotes epidémicos de histoplasmosis en Cuba, han sido relativamente frecuentes los informes sobre nuevos brotes con características similares en casi todas las provincias (Nocedo Pous *et al.*, 1965; Fernández Andreu y Martínez Machín 1996). En todos los presentados en este estudio se localizó y confirmó la fuente de infección y constituyen una muestra de la forma en que pueden ocurrir estos brotes. Los motivos para la entrada y permanencia en cuevas pueden ser muy diversos, pero en todos se ha informado sobre la presencia de guano de murciélagos y la realización de actividades generadoras de aerosoles, así como la ausencia total o casi total de medidas de protección (Fernández Llanes *et al.*, 1987). La metodología propuesta para el estudio de estos brotes permite, de manera integral, la caracterización de los mismos y la adopción de medidas para su control por parte de las autoridades correspondientes. La frecuencia con que han aparecido estos brotes en los últimos años, nos hace pensar que el hongo está ampliamente diseminado en nuestro medio, aún cuando quedan muchas áreas por estudiar (figura 6).

La distribución por provincias (incluidos los brotes epidémicos) no ha sido homogénea; el 96 % de los casos han sido descritos en las provincias occidentales (anexo 16), lo cual no indica necesariamente, una mayor endemidad en esta zona geográfica, sino que ha sido ésta el área más estudiada debido a la cercanía de los principales laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, es conveniente aclarar que estos datos se han obtenido fundamentalmente a partir de lo publicado en la literatura médica nacional y que ha existido siempre en el país un subregistro de casos (Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996). En la figura 6 se presenta la distribución por provincias de los estudios de histoplasmosis realizados en Cuba, según datos del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK y de la literatura médica nacional.

Las encuestas realizadas mediante pruebas intradérmicas de histoplasmina permiten tener una idea del grado de exposición de algunos grupos y en algunos casos, de la población en general. De manera resumida, los resultados de estas encuestas se muestran en el anexo 17 (Fuentes y Madiedo, 1960; Nocedo Pous *et al.*, 1965; De Armas Pérez *et al.*, 1978; Castillo Méndez *et al.*, 1988; Suárez Hernández *et al.*, 1992; Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996). Los grupos con porcentajes de positividad más altos, han sido precisamente aquellos que han tenido como antecedente una exposición prolongada o reiterada a lugares habitados por murciélagos o aves. (De Armas Pérez *et al.*, 1978; Castillo Méndez *et al.*, 1988; Suárez Hernández *et al.*, 1992).

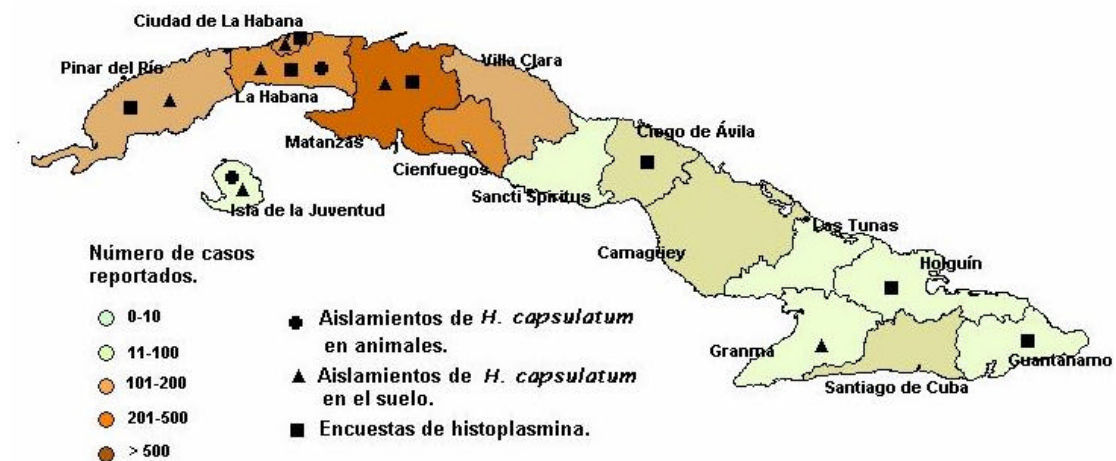


Figura 6. Distribución por provincias de los estudios de histoplasmosis en Cuba.

Los trabajadores de granjas avícolas constituyen uno de los grupos que merece ser estudiado más profundamente. En un estudio previo realizado no fueron detectados anticuerpos anti-*H. capsulatum* mediante pruebas de inmunoprecipitación en trabajadores avícolas (Suárez Hernández *et al.*, 1997), lo que coincide con lo señalado por otros autores, en cuanto a la utilidad de cada una de estas pruebas (Negroni, 1982; Kaufman, 1992; Taylor *et al.*, 1993; González-Zepeda *et al.*, 1998).

Según la legislación vigente en el país, la histoplasmosis está incluida entre las enfermedades profesionales y, sólo en esos casos, se considera objeto de declaración obligatoria a las autoridades competentes (Resolución Conjunta No. 2/96, MINSAP-MTSS, 1996).

En la población general (individuos supuestamente sanos y sin riesgo profesional de exposición al agente causal) el porcentaje de positividad ha sido de 14,5 % (Fuentes y Madiedo, 1960; Suárez Hernández *et al.*, 1992; Fernández Andreu *et al.*, 1994). Resulta difícil hacer una evaluación definitiva de los resultados de estas encuestas histoplasmínicas por diversas razones: los grupos poblacionales han sido muy diversos, el número de individuos ha sido limitado, se han utilizado diferentes antígenos y los criterios para la ejecución y lectura de las pruebas no han sido uniformes, ya que fueron realizadas en momentos muy diferentes y no han abarcado a todo el país (Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996).

Posiblemente uno de los grupos de riesgo más importantes en la histoplasmosis sean los individuos portadores del VIH y enfermos de SIDA. La forma diseminada progresiva de la histoplasmosis ha emergido como una importante infección oportunista entre los pacientes cubanos de SIDA (Arteaga Hernández *et al.*, 1998).

En individuos infectados por el VIH, la histoplasmosis puede presentarse como resultado de una infección primaria (exógena) o de una reactivación de una infección anterior (endógena). En estudios realizados en nuestro país, ambas vías de infección se han observado (Fernández Andreu *et al.*, 1996), lo que se corresponde con lo que ocurre en otras zonas endémicas (Salzman *et al.*, 1988; Johnson y Sarosi, 1994).

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones fúngicas en general, y de la histoplasmosis en particular, continúa siendo difícil, especialmente en pacientes inmunocomprometidos: los síntomas y signos no son específicos, los hemocultivos tienen una baja sensibilidad, la respuesta inmune humoral específica está disminuida y el estado general de los pacientes muchas veces no permite el empleo de procedimientos invasivos (Stevens, 2002; Wheat, 2003).

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* con agentes antifúngicos han alcanzado un importante desarrollo en los últimos años, sin embargo, todavía quedan muchos aspectos que se deben continuar estudiando (Perea y Patterson, 1999; Rodríguez-Tudela *et al.*, 2002). En este sentido, aunque aún no existen reportes lo suficientemente documentados de resistencia a antifúngicos en esta especie, el poder contar con una metodología para evaluar el comportamiento *in vitro* de *H. capsulatum* representa un aporte importante tanto al conocimiento microbiológico, como a sus posibles implicaciones en la terapéutica de la histoplasmosis, ya que permitiría la selección del fármaco más adecuado, la evaluación de nuevos agentes antifúngicos (Maschmeyer, 2002) y pudiera, por otra parte, explicar la causa de algunos fallos terapéuticos debidos al desarrollo de resistencia. El método utilizado, partiendo de la fase miceliana, permite además evaluar la actividad antifúngica de determinados agentes químicos con vistas a su posible aplicación en la descontaminación de ambientes naturales, tales como cuevas, túneles, refugios, edificaciones, etc.

Cuba se encuentra ubicada en una zona geográfica con condiciones ecológicas favorables para el desarrollo saprofítico de *H. capsulatum*. La forma del país (isla larga y estrecha, extendida de este a oeste) hace que no sean muy marcadas las variaciones climáticas entre una región y otra. Se puede asegurar que si bien esta micosis ha sido descrita en todas las provincias del país, se hace necesario profundizar en aspectos tales como la realización de encuestas histoplasminicas adecuadamente diseñadas, el conocimiento de las formas clínicas más frecuentes y su relación con el SIDA, así como la aplicación de técnicas de diagnóstico más rápidas, específicas, sensibles y económicas. Todo esto unido al estudio y caracterización fenotípica y genotípica de las cepas aisladas de *H. capsulatum* permitirá abrir nuevas perspectivas a las investigaciones relacionadas con el conocimiento y control de la histoplasmosis en el país.

CONCLUSIONES

1. El protocolo desarrollado permitió detectar la presencia de *H. capsulatum* en el 58,8 % de las cuevas estudiadas, y aislar, por primera vez en Cuba, esta especie en hábitats relacionados con aves y en espacios abiertos, lo cual tiene importancia epidemiológica.
2. El 24 % de los murciélagos analizados estaban infectados con *H. capsulatum*. Por primera vez, se reporta en Cuba su aislamiento en la especie *Tadarida brasiliensis muscula*; y constituye también el primer reporte a nivel mundial en la especie *Macrotus waterhousei minor* lo cual reafirma la importancia de estos animales en la ecología de *H. capsulatum* en nuestro medio.
3. Se estableció una metodología integral para el estudio de la histoplasmosis que incluye el diagnóstico clínico, epidemiológico, micológico y serológico, así como el aislamiento del agente etiológico de las fuentes de infección de los brotes epidémicos y la toma de medidas de prevención y control.
4. La prueba de exoantígenos demostró ser una técnica confirmatoria sencilla, rápida y de alta especificidad para la identificación de los aislamientos clínicos y ambientales de *H. capsulatum*. Por primera vez en el país, se utilizó la técnica de ELISA para el estudio de brotes epidémicos de histoplasmosis, la cual ha demostrado ser una herramienta útil para el diagnóstico.
5. Las cepas estudiadas de *H. capsulatum* mostraron valores bajos de CMI, con medias geométricas de 0,125, 0,16 y 0,26 µg/mL para el itraconazol, el ketoconazol y la anfotericina B respectivamente, mientras que frente al fluconazol la mayoría de las cepas (62 %) mostraron valores iguales o superiores a 64 µg/mL, con una media geométrica de 55,4 µg/mL.

RECOMENDACIONES

-
1. Hacer estudios micológicos en todas aquellas cuevas, refugios, túneles u otros sitios similares, antes de su posible explotación con fines diversos.
 2. Completar los estudios destinados a conocer la presencia de *H. capsulatum* en otras especies animales, tanto domésticas como de la fauna silvestre en Cuba.
 3. Sugerir el empleo de la metodología propuesta en este trabajo para el estudio integral de la histoplasmosis en el país
 4. Perfeccionar los sistemas de diagnóstico serológico para lograr métodos más sensibles y específicos, incluidos los sistemas de detección de antígenos, así como caracterizar y comparar los aislamientos clínicos y ambientales de *H. capsulatum* por técnicas de ADN, lo que permitirá precisar el origen y circulación de las de cepas.
 5. Ampliar los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos con un mayor número de cepas y evaluar su relación con la evolución clínica de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Ajello L, Kuttin ES, Beemer AM, Kaplan W, Padhye A. Occurrence of *Histoplasma capsulatum* Darling, 1906 in Israel, with a review of the current status of histoplasmosis in the Middle East. Am J Trop Med Hyg 1977; 26: 140-147.
 - Allendoerfer R, Deepe GS. Infection with *Histoplasma capsulatum*: host-fungus interface. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 256-260.
 - Almeyda L, García B, Noriega V, Grenier JE, Suárez Z. Estudio de un brote de bronconeumonía por *Histoplasma capsulatum* en campistas. Memorias Congreso 50 Aniversario del IPK, La Habana, 1988:MP539A.
 - Ampel NM. Delayed-type hypersensitivity, *in vitro* T-cell responsiveness and risk of active coccidioidomycosis among HIV-infected patients living in the coccidioidal endemic area. Med Mycol 1999; 37: 245-250.
 - Arango M, Castañeda E. Micosis Humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos. Bogotá: Corporación para las Investigaciones Biológicas (CIB) y Medellín: Instituto Nacional de Salud (INS), 1995: 85-92.
 - Arenas R. Micología Médica Ilustrada. México DF: Interamericana. McGraw-Hill, 1993: 359-376.
 - Arteaga Hernández E, Capó de Paz V, Pérez Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el SIDA. Un estudio de 211 autopsias. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 33-35.
 - Ashford DA, Hajjeh RA, Kelley MF, Kaufman L, Hutwagner L, McNeil MM. Outbreak of histoplasmosis among cavers attending the National Speleological Society Annual Convention, Texas, 1994. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 899-903.
 - Ashmeade-Dyer A, Lowe M, Dyer H. Histoplasmosis en Jamaica. Bol Of Sanit Panam 1979; 86: 456-458.
 - Balows A, Hausler WJ (editores). Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections. 6th ed. Washington: American Public Health Association, 1981: 957-965.
 - Barquet Chediak A, Chediak M, Magriñat G. Histoplasmosis: resumen de la enfermedad. Presentación de un caso diagnosticado por punción ganglionar. Rev Kuba 1951; 7: 153-143.

-
- Bartlett PC, Vonbehren LA, Tewari RP, Martin RJ, Eagleton L, Isaac MJ, Kulkarni PS. Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. *Am J Pub Health* 1982; 72: 1369-1372.
 - Bennet J. Fluconazole: an overview. Langhorne: ADIS Press International Inc.; 1990.
 - Berliner MD. Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*. I. Macro and micromorphology of the mycelial phase. *Sabouraudia* 1968; 6: 111-118.
 - Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertsohn VJ, Knobloch J, Hohle R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1644-1647.
 - Bialek R, Ernst F, Dietz K, Najjar LK, Knobloch J, Graybill JR, Schaumburg-Lever G. Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 597-603.
 - Body BA, Spicer A, Burgwyn CM. Immunoidentification of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis* with commercial exoantigen reagents. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 519-522.
 - Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 2ª ed. México DF: Méndez Editores, S.A. de C.V., 2000: 257-273.
 - Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gómez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1753-1755.
 - Bradsher RW. Histoplasmosis and blastomycosis. *Clin Infect Dis* 1996; 22(Suppl 2): S102-S111.
 - Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B: Current understanding of mechanism of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 183-188.
 - Bulmer AC, Bulmer GS. Incidence of histoplasmin hypersensitivity in the Philippines. *Mycopathologia* 2001; 149: 69-71.

-
- Buxton JA, Dawar M, Wheat LJ, Black WA, Ames NG, Mugford M, Patrick DM. Outbreak of histoplasmosis in a school party that visited a cave in Belize: role of antigen testing in diagnosis. *J Travel Med* 2002; 9: 48-50.
 - Capó de Paz V, Rodríguez ME, Borrajero Martínez IP, Martínez Rodríguez R. Reporte del primer caso de histoplasmosis cutánea en un paciente cubano de SIDA. *Actas Dermosifilogr* 1990; 81: 429-431.
 - Carmona Fonseca J. Epidemiología de las micosis. En: Carmona Fonseca J, Escobar de V. ML (ed). *Micología. Manual de Laboratorio*. Facultad de Medicina. Medellín: Universidad de Antioquia, 1995: 152-171.
 - Carr J, Shearer G. Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol* 1998; 180: 6697-6703.
 - Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis* 1997; 18: 1047-1053.
 - Castañeda E, de Coppiano CI, Raad J, Ajello L, Weeks R, Marin H, Coppiano T, Jiménez H. Brote epidémico de histoplasmosis asociado con exposición a un árbol hueco. *Acta Med Colomb* 1983; 8: 17-22.
 - Castillo Méndez A, García Landa J, Rodríguez Díaz T, Sola Server M, Suárez Martínez O, Ortiz I. Estudio de prevalencia de histoplasmosis en un grupo de trabajadores. *Bol Epidemiol* 1988; 3: 9-11.
 - Chang Puga M, Font D'Escoubet E. Reporte preliminar de dos brotes epidémicos de histoplasmosis pulmonar aguda. *Bol Hig Epidemiol* 1974; 12: 3-15.
 - Chávez-Tapia, CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998; 11: 187-191.

-
- Chemaly RF, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, Chua JD, Procop GW. Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using the *AccuProbe* on an excised valve. J Clin Microbiol 2001; 39: 2640-2641.
 - Chin J. (ed.). El control de las enfermedades transmisibles. 17ª ed. Washington DC. OPS, 1999: 355-359.
 - Cisneros Despaigne E, Font D'Escoubet E, Fors Cruz ME. Histoplasmosis: seguimiento serológico. Rev Cubana Med Trop 1989; 41: 127-134.
 - Collazo Caballero S, Ochoa C. Eritema multiforme en el curso de una infección por *Histoplasma capsulatum*. Memorias III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. La Habana, 1986:354.
 - Connolly P, Wheat J, Schnitzlein-Bick C, Durkin M, Kohler S, Smedema M, Goldberg J, Brizendine E, Loebenberg D. Comparison of a new triazole antifungal agent, Schering 56592, with itraconazole and amphotericin B for treatment of histoplasmosis in immunocompetent mice. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 322-328.
 - Constantine DG. Geographic translocation of bats: known and potential problems. Emerg Infect Dis 2003; 9: 17-21.
 - Contreras C, Shibayama H, Gutiérrez P. Aportaciones del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos a la histoplasmosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 216-220.
 - Corti ME, Negroni R, Esquivel P, Villafañe MF. Histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA: análisis epidemiológico, clínico, microbiológico e inmunológico de 26 pacientes. Enf Emerg 2004; 6: 8-15.
 - Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? Rev Iberoam Micol 2002; 19: 133-138.
 - Darling ST. A protozoön general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen and lymph nodes. J Amer Med Ass 1906; 46: 1283-1285.

-
- Davies SF, Colbert RL. Concurrent human and canine histoplasmosis from cutting decayed wood. *Ann Intern Med* 1990; 113: 252-253.
 - De Armas Pérez L, Font D'Escoubet E, González Ochoa E, Macola Olano S. Histoplasmosis pulmonar: estudio clínico epidemiológico de un brote en estudiantes. *Rev Cubana Med* 1978; 17: 541-551.
 - De Hoog GS, Guarro J (ed.). *Atlas of Clinical Fungi*. Baarn/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 1995: 125-128 .
 - De Hoog GS. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. *Mycoses* 1996; 39: 407-417.
 - Deepe GS, Gibbons R. Protective efficacy of H antigen from *Histoplasma capsulatum* in a murine model of pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 2001; 69: 3128-3134.
 - Deepe GS, Seder RA. Molecular and cellular determinants of immunity to *Histoplasma capsulatum*. *Res Immunol* 1998; 149: 397-406.
 - Deepe GS. Prospects for the development of fungal vaccines. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 585-596.
 - Delgado Fernández R, Santana Garay J. Histoplasmosis en la cavidad bucal: presentación de 3 casos. *Rev Cubana Estomatol* 1978; 15: 81-91.
 - Diercks FH, Shacklette MH, Kelley HB, Klite PD, Thompson W, Marvin Keenan C. Naturally occurring histoplasmosis among 935 bats collected in Panama and the Canal Zone, July 1961-February 1963. *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14: 1069-1072.
 - DiSalvo AF, Ajello L, Palmer JW, Winkler WG. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *Am J Epidemiol* 1969; 89: 606-614.
 - DiSalvo AF, Bigler WJ, Ajello L, Johnson JE, Palmer J. Bat and soil studies for sources of histoplasmosis in Florida. *Pub Health Rep* 1970; 85: 1063-1069.
 - DiSalvo AF, Johnson NM. Histoplasmosis in South Carolina. Support for microfocus concept. *Amer J Epidemiol* 1979; 4: 480-490.

-
- DiSalvo AF. Mycotic morbidity. An occupational risk for mycologists. *Mycopathologia* 1987; 99: 147-153.
 - Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 653-657.
 - Dixon DM, Casadevall A, Klein B, Mendoza L, Travassos L, Deepe GS. Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36(Suppl 1): 57-67.
 - Dupont B. Mycoses pulmonaires exotiques. *Rev Pneumol Clin* 1998; 54: 301-308.
 - Eissenberg LG, Moser SA, Goldman WE. Alterations to the cell wall of *Histoplasma capsulatum* yeast during infection of macrophages or epithelial cells. *J Infect Dis* 1997; 175: 1538-1544.
 - Elias Costa MR, Lacaz CS, Kawasaki M, De Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. *Med Mycol* 2000; 38 (Suppl 1): 139-145.
 - Ellis DH. *Clinical Mycology. The human opportunistic mycoses*. Underdale: Pfizer Inc, 1994: 84-90.
 - Emmons CW, Binford CH, Utz JP, Kwon-Chung KJ. *Medical Mycology*. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1977: 305-331.
 - Erkens K, Lademann M, Tintelnot M, Kaben U, Reisinger EC. Histoplasmosis group disease in bat researchers returning from Cuba. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: 21-25.
 - Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC, Martínez-Suárez JV, Scalice G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Mycol* 1998; 36(Suppl 1): 68-78.
 - Espinel-Ingroff A. In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 198-202.
 - Farina C, Gnechi F, Michetti G, Parma A, Cavanna C, Nasta P. Imported and autochthonous histoplasmosis in Bergamo Province, Northern Italy. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 271-274.

-
- Fava SDC, Fava Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 40: 155-164.
 - **Fernández Andreu CM**, Cadre Ratón AM, Martínez Machín G, Llop Hernández A, Suárez Hernández M. Relación entre la prueba intradérmica de histoplasmina y los niveles de anticuerpos detectables por ELISA e inmunodifusión. Rev Inst Med Trop S Paulo 1994; 36: 83-87.
 - **Fernández Andreu CM**, Corral Varona C, Martínez Machín G, Rodríguez Barreras ME, Ruiz Pérez A. Histoplasmosis diseminada progresiva en pacientes con SIDA. Rev Cubana Med Trop 1996; 48: 163-166.
 - **Fernández Andreu CM**, González Miranda M, Illnait Zaragoza MT, Martínez Machín G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Rev Cubana Med Trop 1998; 50: 48-53.
 - **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G, Fernández Llanes R, Llop Hernández A. Detección de anticuerpos anti-*Histoplasma capsulatum* mediante la técnica de ELISA: estudio preliminar. Rev Cubana Med Trop 1992; 44: 112-117.
 - **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e histoplasmosis en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol 1996; 34: 34-42.
 - Fernández Llanes R, **Fernández Andreu CM**, Fuentes González O. Riesgo biológico asociado con trabajos de campo: informe de dos casos de histoplasmosis. Rev Cubana Med Trop 1987; 39: 61-67.
 - Flor A, Estivill D, Pérez R, Ordeig J, Ramos F, Soler Bel J, Puig X. Histoplasmosis pulmonar aguda en un viajero español a Nicaragua: ejemplo de enfermedad importada. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 24-28.
 - Font D'Escoubet E, Cisneros Despaigne E, Macola Olano S. Identificación inmunológica de *Histoplasma capsulatum* por contrainmunolectroforesis. Rev Cubana Med Trop 1985; 37: 348-353.

-
- Font D'Escoubet E, Cisneros Despaigne E, Roche Bermúdez MA. Histoplasmosis pulmonar crónica: informe de un caso. Rev Cubana Med Trop 1985; 37: 66-71.
 - Font D'Escoubet E, Macola Olano S, Chang Puga M. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del medio en Cuba. Rev Cubana Med Trop 1975; 27: 115-127.
 - Font D'Escoubet E, Macola Olano S. *Histoplasma capsulatum*: aislamiento de murciélagos en Cuba. Rev Cubana Med Trop 1976; 28: 119-125.
 - Fressatti R, Dias-Siqueira VL, Svidzinski TIE, Herrero F, Kemmelmeier C. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 53-58.
 - Fuentes CA, Madiedo O. Breve reporte sobre la epidemiología de la coccidioidomicosis, la histoplasmosis y la blastomicosis en Cuba: parte I: pruebas cutáneas en los campesinos que vinieron de la provincia de Oriente a la concentración del 26-7-59 en La Habana. Arch Hosp Univ 1960; 12: 301-316.
 - Fujio J, Nishimura K, Miyaji M. Epidemiological survey of the imported mycoses in Japan. Jpn J Med Mycol 1999; 40: 103-109.
 - Galgiani JN, Rinaldi MG, Polak AM, Pfaller MA. Standardization of antifungal susceptibility testing. J Med Vet Mycol 1992; 30(Suppl 1): 213-224.
 - Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. Rev Infect Dis 1990; 12: 308-329.
 - García NM, Assis CM, Del Negro GMB, Lacaz CS. Obtenção de exoantígenos de *Histoplasma capsulatum* em meio de neopeptona, glicose, tiamina e asparagina (NGTA). Rev Inst Med Trop São Paulo 1990; 32: 370-374.
 - Garringer TO, Wheat LJ, Brizendine EJ. Comparison of an established antibody sandwich method with an inhibition method of *Histoplasma capsulatum* antigen detection. J Clin Microbiol 2000; 38: 2909-2913.
 - Gascón J, Torres JM, Luburich P, Ayuso JR, Xaubet A, Corachán M. Imported histoplasmosis in Spain. J Travel Med 2000; 7: 89-91.

-
- Gaur PK, Lichtwardt RW. Mating types and convertibility among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Mycologia 1980; 72: 404-406.
 - George RB, Penn RL. Histoplasmosis. En: GA Sarosi, SF Davies (ed.) Fungal diseases of the lung. 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd., 1993: 39-50.
 - Gilbert DN, Moellering RC, Sande MA. The Sanford Guide to antimicrobial therapy 2001. 31st ed. Hyde Park. JC Sanford Publisher, 2001.
 - Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobón A, Restrepo A, Hay RJ. Detection of the 70-kilodalton *Histoplasma capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up. J Clin Microbiol 1999; 37: 675-680.
 - González Ibarzábal JE, Silverio Sánchez M. Histoplasmosis y miconazol (reporte de un caso) Rev 3 de diciembre 1990; 4: 185-190.
 - González Menocal I, Suárez Hernández M, Gallegos Machado M, Hernández Montoya N, Cotelso Alfonso A. Presentación de dos casos de histoplasmosis pulmonar. Rev Cubana Hig Epidemiol 1985; 23: 282-287.
 - González Menocal I, Suárez Hernández M, Pérez González L, Díaz Rodríguez J. Estudio clínico epidemiológico de un brote de histoplasmosis pulmonar en el municipio de Morón. Rev Cubana Hig Epidemiol 1990; 28: 179-183.
 - González Ochoa E. Información sobre los estudios de histoplasmosis en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol 1983; 21: 210-214.
 - González Zepeda I, Vargas Yáñez R, Velazco Castrejón O, Taylor ML. Histoplasmosis. Rev Fac Med UNAM 1998; 41: 12-15.
 - Goodwin RA, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in normal hosts. Medicine (Baltimore) 1981; 60: 231-266.
 - Graybill JR. Histoplasmosis and AIDS. J Infect Dis 1988; 158: 623-626.
 - Greer DL, McMurray DN. Pathogenesis of experimental histoplasmosis in the bat, *Artibeus lituratus*. Am J Trop Med Hyg 1981; 30: 653-659.

-
- Grupo Epidemiológico Central de los Servicios Médicos de las FAR. Investigación epidemiológica de un brote de histoplasmosis en las FAR. Rev Serv Med FAR 1966; 3: 34-41.
 - Gugnani HC, Muotoe-Okafor F. African histoplasmosis: a review. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 155-159.
 - Hajjeh RA, Pappas PG, Henderson H, Lancaster D, Bamberger DM, Shahan KJ, Phelan MA, Cloud G, Holloway M, Kauffman CA, Wheat LJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. Multicenter case-control study of risk factors for histoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected persons. Clin Infect Dis 2001; 32: 1215-1220.
 - Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. Med Mycol 1998; 36: 351-364.
 - Hay RJ, White HSJ, Fields PE, Quamina DBE, Dan M, Jones TR. Histoplasmosis in the eastern Caribbean: a preliminary survey of the incidence of the infection. J Trop Med Hyg 1981; 84: 9-12.
 - Hearn VM. Structure and function of the fungal cell wall. En: Jacobs PH, Nall L (ed.). Fungal Diseases. Biology, immunology, and diagnosis. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997: 27-60.
 - Heel RC. Ketoconazole: Pharmacological profile. In vitro and in vivo activity. In: Levine HB. Ketoconazole in the management of fungal diseases, New York: ADIS Press, 1982: 55-74.
 - Hove MGM, Woods GL. Duration of fungal culture incubation in an area endemic for *Histoplasma capsulatum*. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 28: 41-43.
 - Howard DH. The epidemiology and ecology of blastomycosis, coccidioidomycosis and histoplasmosis. Zbl Bakt Hyg A 1984; 257: 219-227.
 - Hunt PJ, Harden TJ, Hibbins M, Pritchard RC, Muir DB, Gardner FJ. *Histoplasma capsulatum* isolation from Australian cave environment and from a patient. Med J Aust 1984; 141: 280-283.

-
- Imwidthaya P. Systemic fungal infections in Thailand. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 395-399.
 - Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, Lee CH. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 241-245.
 - Jiménez Jiménez JA, Taquechel Tusiente N. Histoplasmosis pulmonar: reporte de un caso. *Rev Cubana Med* 1965; 4: 420-425.
 - Jiménez RA, Uran ME, de Bedout C, Arango M, Tobon AM, Cano LE, Restrepo A. Brote de histoplasmosis aguda en un grupo familiar: identificación de la fuente de infección. *Biomédica (Bogotá)* 2002; 22: 155-159.
 - Johnson PC, Khardori N, Najjar AF, Butt F, Mansell PWA, Sarosi GA. Progressive disseminated histoplasmosis in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am J Med* 1988; 85: 152-158.
 - Johnson PC, Sarosi GA. Progressive disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. *HIV: Adv Res Ther* 1994; 4: 15-21.
 - Jones TF, Swinger GL, Craig AS, McNeil MM, Kaufman L, Schaffner W. Acute pulmonary histoplasmosis in bridge workers: a persistent problem. *Am J Med* 1999; 106: 480-482.
 - Kappe R, Levitz S, Harrison TS, Ruhnke M, Ampel NM, Just-Nübling G. Recent advances in cryptococcosis, candidiasis and coccidioidomycosis complicating HIV infections. *Med Mycol* 1998; 36 (Suppl 1): 207-215.
 - Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, Da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancoppe-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 2003; 12: 3383-3401.
 - Kauffman CA, Carver PL. Antifungal agents in the 1990s. *Drugs* 1997; 53: 539-549.
 - Kaufman L, Standard PG. Immunoidentification of cultures of fungi pathogenic to man. *Curr Microbiol* 1978; 1: 135-140.

-
- Kaufman L, Standard PG. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41: 209-225.
 - Kaufman L. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin Infect Dis* 1992; 14(Suppl 1): 23-29.
 - Klite PD. Intestinal bacterial flora and transit time of three neotropical bat species. *J Bacteriol* 1965; 90: 375-379.
 - Kobayashi GS, Travis SJ, Medoff G. Comparison of fluconazole with amphotericin B in treatment of histoplasmosis in normal and immunosuppressed mice. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl 3): 291-293.
 - Kobayashi GS, Travis SJ, Rinaldi MG, Medoff G. In vitro and in vivo activities of Sch 39304, fluconazole, and amphotericin B against *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 524-528.
 - Kohler S, Wheat LJ, Conolly P, Schizlein-Bick C, Durkin M, Smedema M, Goldberg J, Brizendine E. Comparison of the echinocandin Caspofungin with amphotericin B for the treatment of histoplasmosis following pulmonary challenge in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1850-1854.
 - Koneman EW, Roberts GD. *Micología Práctica de Laboratorio*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1987:134-143.
 - Kumar BV, Maresca B. Purification of membranes and identification of phase-specific proteins of the dimorphic pathogenic fungi *Histoplasma capsulatum*. *Arch Biochem Biophys* 1988; 261: 212-221.
 - Kwon Chung KJ. Sexual stage of *Histoplasma capsulatum*. *Science* 1972; 475: 325.
 - Lacaz CS, Del Negro GMB, Vidal MSM, Heins-Vicari EM, Santos RF, Martins MA, Ozaki MM, Romiti R, Proenças R, Castro LGM. Atypical disseminated cutaneous histoplasmosis in an immunocompetent child caused by an "aberrant" variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41: 195-202.

-
- Lacaz CS, Porto E, Costa Martins JE. Micología Médica. 8ª ed. S. Paulo: Ed. Sarvier, 1991: 327-341.
 - Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação. Fungos, Actinomicetos, Algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1998: 250-256.
 - Lachmanan SR, Haniza O, Hisham AN, Subramaniam J, Merican I. Histoplasmosis presenting with progressively worsening backache – a case report. Ann Acad Med Singapore 2001; 30: 656-658.
 - Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M, Johnson EM. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). Epidemiol Infect 2001; 126: 397-414.
 - Laochumroonvorapong P, DiCostanzo DP, Wu H, Srinivasan K, Abusamieh M, Levy H. Disseminated histoplasmosis presenting as pyoderma gangrenosum-like lesions in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Int J Dermatol 2001; 40: 518-521.
 - Lappe P, Ulloa M, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. Levaduras asociadas al hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 162-172.
 - Leng Díaz W, Rábago Pérez F, Isaac Pillot H, Almeida González L, Ruiz de Zárate Eiseman A. Meningoencefalitis por *Histoplasma capsulatum*: presentación de un caso. Rev Cubana Med 1992; 31: 139-144.
 - Lenhart SW, Schafer MP, Singal M. Histoplasmosis: Protecting workers at risk. DHHS (NIOSH) Publication No. 97-146 September 1997.
 - Lenhart SW. Recommendations for protecting workers from *Histoplasma capsulatum* exposure during bat guano removal from a Church's attic. Appl Occup Environ Hyg 1994; 9: 230-236.
 - León Blanco F, Sanguily J, Fernández Ferrer O. Diagnóstico de la histoplasmosis por los métodos de laboratorio. Rev Cubana Lab Clin 1952; 6: 471-479.

-
- Limaye AP, Connolly PA, Sagar M, Fritsche TR, Cookson BT, Wheat LJ, Stamm WE. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. N Engl J Med 2000; 343: 1163-1166.
 - Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J Clin Microbiol 2001; 39: 3505-3511.
 - Lopes JO, Streher LA, Schopf, Benevenga JP, Fenalte AA, Righi RA. Lesões cutâneas na histoplasmosse disseminada progressiva associada com SIDA. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27: 171-174.
 - López-Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares LR. Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. México DF: Ed. Trillas, 1995: 83-87.
 - Lottenberg R, Waldman RH, Ajello L, Hoff GL, Bigler W, Zellner SR. Pulmonary histoplasmosis associated with exploration of a bat cave. Am J Epidemiol 1979; 110: 156-161.
 - Macola Olano S, Font D'Escoubet E. Valor de la prueba inmunodifusión en el diagnóstico de la histoplasmosis animal. Rev Cubana Med Trop 1977; 29: 81-84.
 - Maresca B, Kobayashi GS. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. Microbiol Rev 1989; 53: 186-209.
 - Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Barth Reller L, Procop GW. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 1295-1298.
 - Maschmeyer G. New antifungal agents - treatment standards are beginning to grow old. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 239-241.
 - McEwen JG, Taylor JW, Carter D, Xu J, Felipe MSS, Vilgalys R, Mitchell TG, Kasuga T, White T, Bui T, Soares CMA. Molecular typing of pathogenic fungi. J Clin Microbiol 2000; 38 (Suppl 1): 189-197.

-
- McMurray DN, Russell LH. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. Am J Trop Med Hyg 1982; 31: 527-531.
 - Meals LT, McKinney WP. Acute pulmonary histoplasmosis: progressive pneumonia resulting from high inoculum exposure. J Ky Med Assoc 1998; 96: 258-260.
 - Medoff G, Sacco M, Maresca B, Schlessiger D, Painter A, Kobayashi GS, Carratu L. Irreversible block of mycelial to yeast transition of *Histoplasma capsulatum*. Science 1986; 231: 476-479.
 - Mellado E, Cuenca Estrella M, Rodríguez Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2002; 20: 523-530.
 - Mensa-Pueyo J, Gatell Artigas JM, Jiménez de Anta Losada MT, Prats Pastor G, Domínguez-Gill Hurlé A, Escofet Mata MC, Martínez Martínez JA. Guía de terapéutica antimicrobiana 2002. 12ª ed. Barcelona: Masson, S.A. 2002.
 - Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Ruoppo E, Lo Muzio L. A case of oral localized histoplasmosis in an immunocompetent patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 753-755.
 - Milewski S, Mignini F, Micossi L, Borowski E. Antihistoplasmal *in vitro* and *in vivo* effect of Lys-Nva-FMDP. Med Mycol 1998; 36: 177-180.
 - Millán Marcelo JC, Díaz Jidy M, Hadad Meléndez P, Menéndez Capote R, Ramos García A, Martínez Machín G. Histoplasmosis diseminada en el curso del SIDA: informe de un caso. Rev Cubana Med Milit 1990; 19: 90-93.
 - Mitchell TG. Micosis sistémicas. En: Joklik WK, Willet HP, Bernard Amos D (ed). Zinsser Microbiología. La Habana: Ed Científico-Técnica, 1983: 1254-1261.
 - Monchy D, Huerre MR, De Bièvre C. Deep-seated fungal diseases in the South Pacific, especially in New Caledonia. Mycoses 1998; 41: 31-34.
 - Montoya Batista B. Histoplasmosis. Presentación de tres casos en la provincia de Holguín. Memorias IV Jornada Provincial de Higiene y Epidemiología, Holguín, 1988.

-
- Morse DL, Gordon MA, Matte T, Eadie G. An outbreak of histoplasmosis in a prison. *Amer J Epidemiol* 1985; 122: 253-261.
 - Mukunyadzi P, Johnson M, Wyble JC, Scott M. Diagnosis of histoplasmosis in urine cytology: reactive urothelial changes, a case diagnostic pitfall. Case report and literature review of urinary tract infections. *Diagn Cytopathol* 2002; 26: 243-246.
 - Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira RM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4487-4494.
 - Naiff RD, Barrett TV, Arias JR, Naiff MF. Encuesta epidemiológica de histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y leishmaniasis mediante pruebas cutáneas. *Bol Of Sanit Panam* 1988; 104: 35-49.
 - Naiff RD, Mok WY, Naiff MF. Distribution of *Histoplasma capsulatum* in Amazonian wildlife. *Mycopathologia* 1985; 89: 165-168.
 - Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M. In vitro antifungal activity of Micafungin (FK463) againsts dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1376-1381.
 - NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved standard. NCCLS document M27-A (ISBN 1-562338-328-0). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, 1997.
 - Negroni R, Iovannitti C, Arechavala AI, Carnovale S, Euguchi K. Preparación y estudio de un exoantígeno de la fase levaduriforme de *Histoplasma capsulatum* para reacciones serológicas. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 282-285.
 - Negroni R. Inmunología de las micosis. En: Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. La Habana: Ed. Científico-Técnica, 1982: 340-362.
 - Negroni R. Micosis asociada al SIDA. Parte 2. *VITAE Acad Biomed Dig* 2001; 9. <http://caibco.ucv.ve/vitae/VitaeNueve/Articulos/Micologia/Micosis/ArchivosHTML/Histoplasmosis.htm>

-
- Nocado Pous B, Prince Baró A, Ferrerons Acevedo F. Contribución al estudio de la epidemiología de la histoplasmosis en Cuba. Rev Cubana Med 1965; 4:143-178.
 - Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cell Microbiol 2003; 5: 203-223.
 - Nosanchuk JD, Gómez BL, Youngchim S, Diez S, Aisen P, Zancopé-Oliveira RM, Restrepo A, Casadevall A, Hamilton AJ. *Histoplasma capsulatum* synthesizes melanin-like pigments *in vitro* and during mammalian infection. Infect Immun 2002; 70: 5124-5131.
 - Núñez Jiménez A. 40 años explorando a Cuba. La Habana: Ed. Academia, 1980.
 - Núñez Jiménez A. Medio siglo explorando a Cuba. La Habana, Imprenta Central de las FAR, 1990.
 - Odds FC, Arai T, DiSalvo AF, Evans EGV, Hay RJ, Randhawa HS, Rinaldi MG, Walsh TJ. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology. J Med Vet Mycol 1992; 30: 1-10.
 - Otcenášek M, Dvorak J, Rasicky B. Some epidemiological aspects of histoplasmosis on the light of Pavlovsky's theory. Folia Parasitol (Praha) 1967; 14: 193-206.
 - Padhye AA, Bennett JE, McGinnis MR, Sigler L, Flisa A, Salkin IF. Biosafety considerations in handling medically important fungi. Med Mycol 1998; 36 (Suppl 1): 258-265.
 - Padhye AA, Pathak AA, Katkar VJ, Hazare VK, Kaufman L. Oral histoplasmosis in India: a case report and an overview of cases reported during 1968-92. J Med Vet Mycol 1994; 32: 93-103.
 - Paphitou NI, Barnett BJ. Solitary parietal lobe histoplasma mimicking a brain tumor. Scand J Infect Dis 2002; 34: 229-232.
 - Pardo OA, Pardo Castelló C, Tucker H. Histoplasmin, coccidioidin and tuberculin sensitivities in Cuba. Bull Panamer Sanit Bur 1952; 32: 527-530.

-
- Pecanha Martins AC, Costa Neves ML, Lopes AA, Querino Santos NN, Araujo 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: 103-106.
 - Pedroso MC, Marcano NC. Contribuição ao estudo de *Histoplasma capsulatum* (Darling, 1906). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1972; 70: 237-239.
 - Perea S, Patterson TF. The role of antifungal susceptibility testing in the management of patients with invasive mycoses. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 180-186.
 - Pérez J, Carrasco L. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S18-S22.
 - Pérez J, Torres R, Joanes J, Terry H. HIV Infection in Cuba. *AIDS HIV Infekt* 1993; 8: 1-9.
 - Pérez Lozano LR, Longchong Ramos M, Valdés Zamora M, Menéndez Venta J, Quintero Cayola S, Amigo de Quesada M. Histoplasmosis diseminada progresiva: presentación de un caso de una niña de 8 años con forma de presentación tumoral pseudomaligna. *Rev Cubana Pediat* 1988; 60: 611-619.
 - Perfect JR, Schell WA, Rinaldi MG. Uncommon invasive fungal pathogens in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Med Vet Mycol* 1993; 31: 175-179.
 - Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Rodero L, Davel G. Molecular characterization of autochthonous clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* using RAPD-PCR. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 160-166.
 - Peterson SW, Sigler L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2918-2925.
 - Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: Technical advances and potencial clinical applications. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 776-784.
 - Pila Pérez R, León Díaz R, Diéguez Tejada R, Sánchez Recio F, Varona Ayala E de, Garmendía Hernández G. Histoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop* 1980; 32: 63-71.

-
- Polak AM, Dixon DM. Fungistatic and fungicidal effects of amphotericin B, ketoconazole and fluconazole (UK 49858) against *Histoplasma capsulatum* in vitro and in vivo. Mykosen 1987; 30: 186-194.
 - Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Fisicaro P, Cantelli C, Magliani W. Antifungal vaccinology. En: Jacobs PH, Nall L (ed.). Fungal disease. Biology, immunology, and diagnosis. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997: 297-313.
 - Randhawa HS, Chaturvedi S, Khan ZU, Chaturvedi VP, Jain SK, Jain RC, Buzaz-Malik G. Epididymal histoplasmosis diagnosed by isolation of *Histoplasma capsulatum* from semen. Mycopathologia 1995; 131: 173-177.
 - Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Med Mycol 2000; 38(Suppl 1): 147-159.
 - Resolución No. 42/99. Lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas. CITMA, 1999.
 - Retallack DM, Woods JP. Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Microb Infect 1999; 1: 817-825.
 - Reyes-Montes MR, Bobadilla-del-Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. J Clin Microbiol 1999; 1404-1408.
 - Reyes-Montes MR, Taylor ML, Curiel-Quesada E, Mesa Arango AC. Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: una revisión de los hallazgos. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 121-126.
 - Ribas Forcadell E, Torres-Rodríguez JM, Espasa M, Gascón J. Utilidad diagnóstica de la prueba intradérmica de histoplasmina en áreas no endémicas de histoplasmosis. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 217.

-
- Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nubling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 821-823.
 - Rippon JW. *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 3th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1988: 381-432.
 - Rivierez M, Hayman D, Brebion A, Landau-Ossondo M, Desbois N, Vally P. Spinal cord histoplasma. A case report. *Neurochirurgie* 2002; 48: 44-48.
 - Roberts GD, Goodman NL. The Diagnostic Clinical Mycology Laboratory. En: GA Sarosi y SF Davies (eds.) *Fungal Diseases of the lung*. 2nd ed., New York: Raven Press, Ltd., 1993: 17-28.
 - Rodríguez Barreras ME, Capó de Paz V, **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G, Ricardo Fonseca ME, Díaz M. Histoplasmosis cutánea diseminada como forma de presentación del SIDA. *Actas Dermosifilogr* 1992; 83: 332-334.
 - Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Mejía A, Duarte-Escalante E, Taylor ML. Organización de la colección de cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos, Facultad de Medicina, UNAM. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998; 11: 243-246.
 - Rodríguez-Tudela JL, Rodero L, Cuenca Estrella M, Córdoba S. V Curso hispano-argentino de Micología Médica. Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio. INELANIS-ISCIH-OPS, Buenos Aires, 2002.
 - Rosenstein ES. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. Ediciones PML S.A. de C.V., 1995.
 - Saccente M, McDonnell RW, Baddour LM, Mathis MJ, Bradsher RW. Cerebral histoplasmosis in the azole era: report of four cases and review. *South Med J* 2003; 96: 410-416.
 - Salomon J, Flament Saillour M, De Truchis P, Bougnoux ME, Dromer F, Dupont B, de Saint-Hardouin G, Perronne C. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis in members of a trekking trip in Martinique, French West Indies. *J Travel Med* 2003; 10: 87-93.

-
- Salzman SH, Smith RL, Aranda CP. Histoplasmosis in patients at risk for acquired immunodeficiency syndrome in a nonendemic setting. *Chest* 1988; 93: 916-921.
 - San-Blas G, San-Blas F. Molecular aspects of fungal dimorfism. *CRC Crit Rev Microbiol* 1983; 11: 101-127.
 - San-Blas G. Regulaciones bioquímicas en el dimorfismo y la virulencia de hongos patógenos para humanos. *Acta Cient Venez* 1992; 43: 3-10.
 - Sandhu GS, Kline BC, Stockman I, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2913-2919.
 - Sanguily J, Fernández Ferrer O, León Blanco F. Histoplasmosis en Cuba. Reporte de un caso con breve revisión de la literatura. *Arch Soc Est Clin Hab* 1951; 44: 1-44.
 - Sastre de la Peña G, Aguila Domenech R, Llorente García G. La histoplasmosis y sus formas clínicas más frecuentes. *Rev Cubana Med* 1987; 26: 1262-1268.
 - Schlech WF, III, Wheat LJ, Ho JL, French MLV, Weeks RJ, Kohler RB, Deane CE, Eitzen HE, Band JD. Recurrent urban histoplasmosis, Indianapolis, Indiana, 1980-1981. *Am J Epidemiol* 1983; 118: 301-312.
 - Sekhon AS, Kaufman L, Moledine N, Summerbell RC, Padhye AA, Ambrosie EA, Panter T. An exoantigen test for the rapid identification of medically significant *Fusarium* species. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 287-289.
 - Severo LC, Berta-Zardo I, Roesch EW, Hartmann AA. Acute disseminated histoplasmosis in Brazil: report of a case and review. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 48-50.
 - Shacklette MH, Hasenclever HF, Miranda EA. The natural occurrence of *Histoplasma capsulatum* in a cave. 2. Ecologic aspects. *Am J Epidemiol* 1967; 86: 246-252.
 - Shacklette MH, Hasenclever HF. Variation of rates of natural infection with *Histoplasma capsulatum* in bats. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18: 53-57.
 - Shadomy S, Pfaller MA. Laboratory studies with antifungal agents: Susceptibility tests and quantitation in body fluids. En: A Balows (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1991: 1173-1183.

-
- Shadomy S, White SC, Yu HP, Dismukes WE, and the NIAID Mycoses Study Group. Treatment of systemic mycoses with ketoconazole: in vitro susceptibilities of clinical isolates of systemic and pathogenic fungi to ketoconazole. J Infect Dis 1985; 152: 1249-1256.
 - Shikanai-Yasuda MA, Duarte MIS, Nunes DF, Lacaz CS, Sabagga E, Abdala E, Duarte AJS, Lopes MH. Paracoccidioidomycosis in a renal transplant recipient. J Med Vet Mycol 1995; 33: 411-414.
 - Silva Taboada G. Los murciélagos de Cuba. La Habana: Ed. Academia, 1979.
 - Silva-Vergara ML, Martínez R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 294-297.
 - Sotgiu G, Mantovani A, Mazzoni A. Histoplasmosis in Europe. Mycopathol Mycol Appl 1970; 40: 53-74.
 - Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. J Antimicrob Chemother 2002; 49 (Suppl 1): 11-19.
 - Suárez Hernández M, Díaz Rodríguez J, Piñón JL, Blanco Torres T, González Menocal I, Coteló Alfonso A. Histoplasmosis: presentación de tres casos en la provincia de Ciego de Ávila en 1982. Rev Cubana Hig Epidemiol 1985; 23: 407-412.
 - Suárez Hernández M, **Fernández Andreu CM**, Alvarez Maturel E, Martínez Machín G, Bravo González JR. Anticuerpos en personal relacionado con la crianza de aves frente a *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Histoplasma capsulatum* en Cuba. Bol Micol (Chile) 1997; 12: 99-101.
 - Suárez Hernández M, **Fernández Andreu CM**, Estrada Ortiz A, Cisneros Despaigne E. Reactividad a la histoplasmina en trabajadores de granjas avícolas de la provincia de Ciego de Avila, Cuba. Rev Inst Med Trop S Paulo 1992; 34: 329-333.
 - Suárez JA, Torres J, Naranjo L, Torres Viera C, Abdul-Hadi S, Rios A, Francoisi J, Dolande M, Rodríguez S, Zerpa N, Capino J. Brote de histoplasmosis asociada a la cueva Alfredo Jahn en Venezuela. VITAE Acad Biomed Dig 2002; 12. <http://caibco.ucv.ve/vitae/VitaeDoce/Articulos/INFECTOLOGIA/archivoshtm/Ppal.htm>

-
- Suh KN, Anekthananon T, Mariuz PR. Gastrointestinal histoplasmosis in patients with AIDS: case report and review. Clin Infect Dis 2001; 32: 483-491.
 - Tamsitt JR, Valdivieso D. Los murciélagos y la salud pública. Estudio con especial referencia a Puerto Rico. Bol Of Sanit Panam 1970; 69: 122-139.
 - Taylor JW, Geisser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 126-146.
 - Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fungal Genet Biol 2000; 30: 207-212.
 - Taylor ML, Chavez-Tapia CB, Vargas-Yanez R, Rodríguez-Arellanes G, Pena-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am J Trop Med Hyg 1999; 61: 914-919.
 - Taylor ML, Granados J, Toriello C, Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the state of Guerrero, Mexico. Mycoses 1996; 39: 375-379.
 - Taylor ML, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montaña-Ortiz G, Pedroza-Serés M. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. Gac Med Mex 2000; 136: 441-448.
 - Taylor ML, Pedroza-Serés M, Gámez Aranda A, Toriello C. Retrospective serological study of histoplasmosis in Mexico. Mycoses 1993; 36: 25-30.
 - Taylor ML, Pérez Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the state of Guerrero, Mexico. Mycopathologia 1997; 138: 137-141.
 - Taylor ML, Reyes Montes MR, Martínez Rivera MA, Rodríguez Arellanes G, Duarte Escalante E, Flores Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. Ciencia y Desarrollo 1997; 136: 59-63.

-
- Taylor ML, Reyes-Montes MR. Nuevos aportes sobre la epidemiología de la histoplasmosis en México. VITAE Acad Biomed Dig 2002; 10. <http://caibco.ucv.ve/vitae/VitaeDiez/Articulos/Micologia/Histoplasmosis/ArchivosHTLM/Antecedentes.htm>
 - Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes Montes MR, Espinosa-Avila L, Chávez-Tapia C. Histoplasmosis in the state of Guerrero, Mexico: a biological approach. Rev Mex Micol 1994; 10: 49-62.
 - Tobon AM, Orozco B, Estrada S, Jaramillo E, Bedout C, Arango M, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis and AIDS: report of the first two Colombian cases. Rev Inst Med Trop S Paulo 1998; 40: 377-381.
 - Torres-Rodríguez JM. Monografías Clínicas en Enfermedades Infecciosas. Micosis Sistémicas. Barcelona: Ed. Doyma, 1991: 5-13.
 - Ueda Y, Sano A, Tamura M, Inomata T, Kamei K, Yokoyama K, Kishi F, Ito J, Mikami Y, Nishimura K. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. Vet Microbiol 2003; 94: 219-224.
 - Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Toriello C, Taylor ML. Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 173-182.
 - Vaca-Marín MA, Martínez Rivera MA, Flores Estrada JJ. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 208-215.
 - Vail GM, Mocherlas S, Wheat LJ, Goldberg J, Camp A, Brizendine E, Schnitzlein-Bick C. Cellular immune response in HIV-infected patients with histoplasmosis. J Acquir Immune Defic Syndr 2002; 29: 49-53.
 - Valdez H, Salata RA. Bat-associated histoplasmosis in returning travelers: case presentations and description of a cluster. J Travel Med 1999; 6: 258-260.
 - Van Crevel R, Van der Ven AJ, Meis JF, Kullberg BJ. Acute pulmonary histoplasmosis as an imported disease. Ned Tijdschr Geneeskde 1997; 141: 1242-1244.

-
- Van Gelderen de Komaid A, Duran E, Borges de Kestelman I. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vipos, La Toma and Choromoro - Trancas, Tucuman, Argentina. Eur J Epidemiol 1999; 15: 383-388.
 - Van Gelderen de Komaid A, Durán EL, Madero AM, Carizo V. Histoplasmosis in Northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucumán. Eur J Epidemiol 1992; 8: 206-210.
 - Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex JH, Sanglard D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. Med Mycol 1998; 36(Suppl 1): 119-128.
 - Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Gupta SS, Improvisi L, Marichal P, Odds FC, Provost F, Ronin O. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. J Med Vet Mycol 1994; 32(Suppl 1): 189-202.
 - Vargas-Yáñez R, Peña-Sandoval GR, Chávez-Tapia CB, Taylor ML. Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 192-194.
 - Velasco-Castrejón O, González Ochoa A. Primary pulmonary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. Mykosen 1977; 20: 393-399.
 - Velasco-Castrejón O. La histoplasmosis pulmonar primaria en México. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 221-225.
 - Warnock DW, Dupont B, Kauffman CA, Sirisanthana T. Imported mycoses in Europe. Med Mycol 1998; 36(Suppl 1): 87-94.
 - Watanabe M, Hotchi M, Nagasaki M. An autopsy case of disseminated histoplasmosis probably due to infection from a renal allograft. Acta Pathol Jpn 1988; 38: 769-780.
 - Weinberg M, Weeks J, Lance-Parker S, Traeger M, Wiersma S, Phan Q, Dennison D, MacDonald P, Lindsley M, Guarner J, Connolly P, Cetron M, Hajjeh R. Severe histoplasmosis in travelers to Nicaragua. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1322-1325.

-
- Wen FQ, Sun YD, Watanabe K, Yoshida M, Wu JNS, Baum GL. Prevalence of histoplasmin sensitivity in healthy adults and tuberculosis patients in Southwest China. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 171-174.
 - Wheat J, Hafner R, Wulfsohn M, Spencer P, Squires K, Powderly W, Wong B, Rinaldi M, Saag M, Hamill R, Murphy R, Connolly-Stringfield P, Briggs N, Owens S and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Clinical Trials and Mycoses Study Group Collaborators. Prevention of relapse of histoplasmosis with itraconazole in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 118: 610-616.
 - Wheat J, Marichal P, Bossche HV, Le Monte A, Connolly P. Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:410-404.
 - Wheat J, Sarosi G, McKinsey D, Hamill R, Bradsher R, Johnson P, Loyd J, Kauffman C. Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 688-695.
 - Wheat J, Wheat H, Connolly P, Kleiman M, Supparatpinyo K, Nelson K, Bradsher R, Restrepo A. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1169-1171.
 - Wheat LJ, Batteiger BE, Sathapatayavongs B. *Histoplasma capsulatum* infections of the central nervous system. A clinical review. *Medicine* 1990; 69: 244-260.
 - Wheat LJ, Chetchotisakdt P, Williams B, Connolly P, Shutt K, Hajjeh R. Factors associated with severe manifestations of histoplasmosis in AIDS. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 877-881.
 - Wheat LJ, Connolly P, Haddad N, Le Monte A, Brizendine E, Hafner R. Antigen clearance during treatment of disseminated histoplasmosis with itraconazole versus fluconazole in patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 248-250.
 - Wheat LJ, Connolly P, Smedema M, Brizendine E, Hafner R, AIDS Clinical Trials Group and the Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome. Clin Infect Dis 2001; 33: 1910-1913.

- Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Blair R, Connolly K, Garringer T, Katz BP, Gupta M. Effect of successful treatment with amphotericin B on *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* polysaccharide antigen levels in patients with AIDS and histoplasmosis. Am J Med 1992; 92: 153-160.
- Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43: 29-37.
- Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. N Engl J Med 1986; 314: 83-88.
- Wheat LJ, Slama TG, Zeckel ML. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Am J Med 1985; 78: 203-210.
- Wheat LJ. Current diagnosis of histoplasmosis. Trends Microbiol 2003; 11: 488-494.
- Wheat LJ. Histoplasmosis in Indianápolis. Clin Infect Dis 1992; 14(suppl 1): 91-99.
- Wheat LJ. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000. Semin Respir Infect 2001; 16: 131-140.
- Wheat LJ. Therapy for severe histoplasmosis: what's best? Clin Infect Dis 2004; 38: 463.
- Wolff M. Brote de histoplasmosis aguda en viajeros chilenos a la selva ecuatoriana: un ejemplo de Medicina Geográfica. Rev Med Chil 1999; 127: 1359-1364.
- Wong SY, Allen DM. Transmission of disseminated histoplasmosis via cadaveric renal transplantation: case report. Clin Infect Dis 1992; 14: 232-234.
- Woods JP, Heinecke EL, Luecke JW, Maldonado E, Ng JZ, Retallack DM; Timmerman MM. Pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. Semin Resp Infect 2001; 16: 91-101.

-
- Woods JP. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. Curr Opin Microbiol 2003; 6: 327-331.
 - Yarzabal L. Técnicas para el estudio inmunológico de las enfermedades parasitarias. Centro Panamericano de Investigación y Adiestramiento en Lepra y Enfermedades Tropicales (CEPIALET), Caracas: OPS/OMS, Instituto Nacional de Dermatología, 1980.
 - Zancopé Oliveira RM, Wanke B. Distribuição das fontes de infecção por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em Río da Prata. Municipio do Río de Janeiro (RJ). Rev Inst Med Trop São Paulo 1987; 29: 243-250.
 - Zhao B, Xia X, Yin J, Zhang X, Wu E, Shi Y, Tong M, Sun S, Gui X, Zhao Z, Ayinuer, Feng X. Epidemiological investigation of *Histoplasma capsulatum* infection in China. Chin Med J 2001; 114: 743-746.
 - Zimmerman SE, Connolly-Stringfield P, Wheat LJ, French MLV, Kohler RB. Comparison of sandwich solid-phase radioimmunoassay and two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen. J Infect Dis 1989; 160: 678-685.
 - Zúñiga-Ramos J, Hernández-Martínez B, Rodríguez-Reyna T, Granados J. Inmunogenética de la histoplasmosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 226-228.

OTROS DOCUMENTOS CONSULTADOS NO PUBLICADOS:

- Bataille Cerianí M. *Histoplasmosis. Estudio de un brote*. Trabajo de Terminación de Residencia en Medicina Interna. La Habana, 1982.
- Leyva Urquiza F. *Estudio radiológico y clínico de un brote de histoplasmosis*. Trabajo de Terminación de Residencia en Radiología. La Habana, 1974.
- Menéndez del Dago H. *Histoplasmosis. Revisión de la enfermedad. Breve estudio epidemiológico basado en la prueba cutánea de histoplasmina*. Trabajo de Terminación de Residencia en Pediatría. La Habana, 1968.
- Paneca Granados F. *Estudio clínico y radiológico de un brote de histoplasmosis en las FAR*. Trabajo de Terminación de Residencia en Medicina Interna. La Habana, 1975.
- Paniagua Estévez ME. *Histoplasmosis pulmonar. Estudio de 358 casos de un brote epidémico*. Trabajo de Terminación de Residencia en Medicina Interna. La Habana, 1970.
- Valdés Díaz S. *Frecuencia de la infección causada por el **Histoplasma capsulatum** en grupos de población seleccionada*. Trabajo de Terminación de Residencia en Neumotisiología. La Habana, 1975.

BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS :

1. **Fernández Andreu CM**, López Abraham AM. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en la Isla de la Juventud. *Rev Cubana Med Trop* 1984; 36: 297-304.
2. **Fernández Andreu CM**, López Abraham AM. Confirmación diagnóstica mediante el cultivo del agente causal en 2 casos de histoplasmosis ocupacional. *Rev Cubana Med Trop* 1986; 38; 32-37.
3. Fernández Llanes R, **Fernández Andreu CM**, Fuentes González O. Riesgo biológico asociado con trabajos de campo: informe de dos casos de histoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop* 1987; 39: 61-67.
4. **Fernández Andreu CM**. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1988; 40: 36-43.
5. **Fernández Andreu CM**, Vilarrubia Montes de Oca OL, Martínez Machín G, Oramas Rodríguez B. Utilización de exoantígenos para la identificación de *Histoplasma capsulatum*. *Rev Cubana Med Trop* 1990; 42; 272-278.
6. **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G, Rodríguez Ponce ME, Millán Marcelo JC. Control de un brote epidémico de histoplasmosis mediante un estudio integral. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 1992; 30: 3-6.
7. **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G. Fuentes de infección de histoplasmosis en la Isla de la Juventud. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992; 34: 441-446.
8. Rodríguez Barreras ME, Capó de Paz V, **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G, Ricardo Fonseca ME, Díaz M. Histoplasmosis cutánea diseminada como forma de presentación del SIDA. *Actas Dermosifilogr* 1992; 83: 332-334.
9. Suárez Hernández M, **Fernández Andreu CM**, Estrada Ortiz A, Cisneros Despaigne E. Reactividad a la histoplasmina en trabajadores de granjas avícolas de la provincia de Ciego de Avila, Cuba. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1992; 34: 329-333.

-
10. **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G. Histoplasmosis en Cuba. *Rev Iberoam Micol* 1994; 11: 52-53.
 11. **Fernández Andreu CM**, Cadre Ratón AM, Martínez Machín G, Llop Hernández A, Suárez Hernández M. Relación entre la prueba intradérmica de histoplasmina y los niveles de anticuerpos detectables por ELISA e inmunodifusión. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1994; 36: 83-87.
 12. **Fernández Andreu CM**, Corral Varona C, Martínez Machín G, Rodríguez Barreras ME, Ruiz Pérez A. Histoplasmosis diseminada progresiva en pacientes con SIDA. *Rev Cubana Med Trop* 1996; 48: 163-166.
 13. **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e histoplasmosis en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 1996; 34: 34-42.
 14. Suárez Hernández M, **Fernández Andreu CM**, Alvarez Maturel E, Martínez Machín G, Bravo González JR. Anticuerpos en personal relacionado con la crianza de aves frente a *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Histoplasma capsulatum* en Cuba. *Bol Micol* (Chile) 1997; 12: 99-101.
 15. **Fernández Andreu CM**, González Miranda M, Illnait Zaragoza MT, Martínez Machín G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50: 48-53.
 16. **Fernández Andreu CM**, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR, Illnait Zaragoza MT, Mendoza Llanes D, Fernández Llanes R, Cruz de Paz R. Contribución al conocimiento de la histoplasmosis en Cuba. *Bol Epidemiol IPK* 1999; 9: 337-338.
 17. **Fernández Andreu CM**. *Histoplasma capsulatum*. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL (ed). *Microbiología y Parasitología Médicas*. La Habana, Editorial Ciencias Médicas, 2001, Cap. 49, p: 509-515.
 18. **Fernández Andreu CM**. Epidemiología de la histoplasmosis en Cuba. *Rev VITAE Acad Biomed Dig* 2001 (9).

<http://caibco.ucv.ve/vitae/VitaeNueve/Articulos/Micologia/Histoplasmosis/ArchivosHTML/Introduccion.htm>

19. Blanco Hernández N, Camino Vilaró M, Castañeda Ruiz R, Decock C, Delgado Rodríguez G, Enríquez Lavandera D, **Fernández Andreu C**, Ferrer Sánchez R, Furrázola Gómez E, González Geigel L, Gutiérrez Amaro J, Herrera Figueroa S, Herrera Oliver P, Herrera Peraza R, van Hove F, Iglesias Brito H, Iturriaga de Capello T, Jodhan D, Lodge DJ, López Mesa MO, Maldonado González S, Mena Portales J, Mercado Sierra A, Minter DW, Ortiz Medina J, Oviedo Prieto R, Pérez Martínez JM, Recio Herrera G, Rodríguez Hernández M. *Fungi of the Caribbean. An annotated checklist*. Minter DW, Rodríguez-Hernández M, Mena Portales J (ed.) PMMS Publishing, London, 2001.
20. **Fernández Andreu CM**, Martínez-León A, Echemendía Medina Y, Martínez-Machín G, Perurena Lancha MR, Illnait-Zaragozí MT. Sensibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* frente a anfotericina B, ketoconazol; itraconazol y fluconazol. *Rev Cubana Med Trop* 2003; 55: 76-82.

TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

1. I JORNADA INTERNA DEL IPK, 1983

- *Histoplasma capsulatum* en la Isla de la Juventud

2. II CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, 1984

- *Histoplasma capsulatum* en la Isla de la Juventud

3. II JORNADA INTERNA DEL IPK, 1984

- Histoplasmosis ocupacional. Confirmación diagnóstica mediante el cultivo del agente causal

4. EVENTO XV ANIVERSARIO DE LA EPB "CARLOS J FINLAY", 1985

- Reporte de dos casos de histoplasmosis asociada a trabajos de campo

5. II CONGRESO NACIONAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA, 1985

- Histoplasmosis ocupacional: Confirmación diagnóstica mediante el aislamiento del agente etiológico.

6. III CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, 1986

- Presencia de *Histoplasma capsulatum* en cuevas
- Histoplasmosis en la Isla de la Juventud
- Riesgo biológico asociado a trabajos de campo: reporte de dos casos de histoplasmosis

7. I JORNADA CIENTÍFICA DE ANIMALES DE ZOOLOGÍA Y FAUNA SILVESTRE, 1986

- Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos cubanos

8. I SIMPOSIO DE ZOOLOGÍA, 1988

- Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos

9. IV SEMINARIO INTERNACIONAL DE ZOONOSIS, 1988

- Papel de los murciélagos en la ecología de *Histoplasma capsulatum*

10. IV JORNADA CIENTÍFICA DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA DE HOLGUÍN, 1988

- Obtención de un antígeno metabólico de *Histoplasma capsulatum* para serología por contrainmunolectroforesis

11. CONGRESO 50 ANIVERSARIO DEL IPK, 1988

- Utilización de exoantígenos para la identificación de *Histoplasma capsulatum*
- Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-*Histoplasma capsulatum*

12. SESIÓN CIENTÍFICA CONJUNTA DE LA SOCIEDAD CUBANA DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA Y EL IPK, 1989

- Estudio de un foco de histoplasmosis

13. II FORUM NACIONAL DE JÓVENES INVESTIGADORES , 1989

- Preparación de un antígeno de *Histoplasma capsulatum* para la normalización de un sistema micro-ELISA indirecto por primera vez en el país

14. IV JORNADA CIENTÍFICA DEL CPHE DE CIUDAD DE LA HABANA, 1989

- Estudio de un foco epidémico de histoplasmosis
- Utilización de ELISA para la detección de anticuerpos específicos inducidos por la administración intradérmica de histoplasmina. Estudio preliminar

15. I JORNADA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA PROVINCIA DE LA HABANA, 1990

- Estudio de un foco de histoplasmosis

16. XII CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 1990

- Estudio de un foco de histoplasmosis. Consideraciones clínicas, epidemiológicas y epizootológicas

17. III CONGRESO NACIONAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA, 1990

- Utilización de ELISA para la detección de anticuerpos inducidos por la administración intradérmica de histoplasmina

18. EVENTO XX ANIVERSARIO DE LA EPB CARLOS J FINLAY, 1990

- Preparación de reactivos biológicos para el diagnóstico de las micosis profundas

19. I TALLER NACIONAL PARA EL USO TURÍSTICO DE LAS CUEVAS Y EL CARSO, 1991

- Importancia del estudio de la histoplasmosis para el desarrollo del espeleoturismo en Cuba

20. SEMINARIO LATINOAMERICANO DE INFECTOLOGÍA, 1992

- Diagnóstico serológico de las micosis profundas en Cuba
- Detección de antígeno de *Histoplasma capsulatum* mediante inmunofluorescencia

21. I CONGRESO INTERNACIONAL DE TURISMO DE SALUD, 1992

- Detección de antígeno de *Histoplasma capsulatum*
- Diagnóstico serológico de las micosis profundas

22. SEMINARIO SOBRE LA INFECCIÓN POR EL VIH Y EL SIDA EN CUBA, 1992

- Diagnóstico de laboratorio de las micosis en seropositivos al VIH y enfermos de SIDA

23. IV CONGRESO LATINOAMERICANO DE MEDICINA TROPICAL, 1993

- Histoplasmosis en Cuba

24. I SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE MICOLOGÍA, 1993

- Micosis oportunistas en pacientes de SIDA en Cuba
- Es endémica la histoplasmosis en Cuba?

25. IV CONGRESO CUBANO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA Y I CONGRESO CUBANO DE MEDICINA TROPICAL, 1993

- Histoplasmosis en Cuba
- Detección de *Histoplasma capsulatum* por inmunofluorescencia
- Micosis en pacientes de SIDA

26. V JORNADA PROVINCIAL DE HIGIENE, EPIDEMIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA DE CIUDAD DE LA HABANA, 1994

- Estudios sobre la histoplasmosis en Cuba

27. II SEMINARIO LATINOAMERICANO DE INFECTOLOGÍA, 1994

- *Histoplasma capsulatum* e histoplasmosis en Cuba

28. VII CONGRESO VENEZOLANO DE BIOANÁLISIS, 1995

- Histoplasmosis en Cuba (conferencia)
- Micosis y SIDA (conferencia)

29. I SIMPOSIO DE ECOLOGÍA BIOSFERA'95

- El suelo como reservorio de los principales hongos patógenos del hombre

30. I TALLER NACIONAL SOBRE COLECCIONES DE CULTIVOS, 1996

- Conservación de hongos de interés médico

31. II CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICOLOGÍA, 1996

- Histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA
- El diagnóstico de laboratorio de las micosis en el SIDA

32. V CONGRESO LATINOAMERICANO DE MEDICINA TROPICAL, 1997

- El diagnóstico de laboratorio de las micosis durante la infección por el VIH (1988-1996)

33. CONGRESO INTERNACIONAL BIOTECNOLOGÍA HABANA'99, 1999

- Sensibilidad de levaduras de interés médico frente a drogas antifúngicas

34. XIII SEMINARIO CIENTÍFICO DEL CNIC. TALLER PRECONGRESO. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, 2000

- Resistencia a antibióticos en hongos y levaduras

35. VI SIMPOSIO DE BOTÁNICA, 2000

- La Micoteca del IPK. Conservación de hongos patógenos

36. JORNADA CIENTÍFICA POR EL ANIVERSARIO DEL SANATORIO DE SANTIAGO DE LAS VEGAS, 2001

- Sensibilidad de *Histoplasma capsulatum* frente a los agentes antifúngicos.

37. XVI CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA, 2002

- Concentración mínima inhibitoria de cuatro antifúngicos en cepas de *Histoplasma capsulatum*.
- Conservación de la colección de cepas de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Micología del IPK.

38. IV CONGRESO VIRTUAL DE MICOLOGÍA, 2003.

- Actividad antifúngica *in vitro* de anfotericina B, ketoconazol, itraconazol y fluconazol frente a *Histoplasma capsulatum*.

39. IV TALLER DE COLECCIONES DE CULTIVOS MICROBIANOS, 2003.

- Colección de cultivos de *Histoplasma capsulatum*. Su organización y riesgo biológico.

ANEXOS }

Anexo 1. Cronología de los hechos más importantes de la historia de la histoplasmosis (Rippon, 1988; Lacaz *et al.*, 1991).

- 1906: Darling describe y nombra al agente etiológico creyendo que era un protozoo encapsulado; tal suposición era falsa pero el nombre dado por él se ha mantenido hasta nuestros días: *Histoplasma capsulatum*.
- 1913: Da Rocha Lima, al comparar los exámenes microscópicos de Darling con un caso de linfangitis epizoótica plantea la identidad fúngica del hallazgo de Darling.
- 1926: Riley y Watson reportan la infección por primera vez en los EEUU, en una mujer en Minnesota, 20 años después del reporte de Darling, esta vez en una región no tropical.
- 1934: Dodd y Tompkins reportan el primer caso *premortem* (un niño). DeMombreum logra cultivar el hongo y revela su dimorfismo y posteriormente demuestra los postulados de Koch mediante la infección experimental en ratones y monos.
- 1940: Negroni estudia el primer caso suramericano (Argentina).
- 1944: Palmer y Christie establecen áreas endémicas mediante las pruebas intradérmicas con histoplasmina. Demuestran que la infección era muy frecuente en ciertas zonas, mientras que las formas graves eran raras. Comienzan a conocerse formas benignas de la enfermedad.
- 1947: Primera epidemia de histoplasmosis, en Oklahoma, EEUU.
- 1948: Se demuestra la eficacia de la prueba de fijación del complemento para el diagnóstico serológico de la histoplasmosis.
- 1949: Emmons aísla al agente etiológico del suelo y demuestra su relación con las excretas de aves.
- 1951: Kligman establece la utilidad de la coloración de PAS para la identificación del hongo en los tejidos. Ajello y Zeidberg señalan que la enfermedad se puede presentar por el contacto con una fuente común bien delimitada en el espacio (microfoco), contaminada generalmente con excretas de aves o murciélagos.
- 1951: Sanguily y Barquet, separadamente, informan los dos primeros casos cubanos de

histoplasmosis.

- 1958-59: Heiner utiliza la prueba de inmunodifusión para el diagnóstico de histoplasmosis. Gordon realiza los primeros estudios de histoplasmosis por inmunofluorescencia.
- Es en la década de los '50 cuando aparece la anfotericina B como una droga efectiva para el tratamiento de la histoplasmosis.
- En las décadas de los '60 y los '70 se desarrollan diferentes sistemas de diagnóstico serológico.
- 1973: Kleger y Kaufman llevan a cabo los primeros ensayos serológicos de histoplasmosis mediante la contraelectroforesis.
- 1976: Para la identificación inmunológica de cepas de *H. capsulatum*, Kaufman y Standard obtienen los exoantígenos y de esta forma diseñan un nuevo método para la identificación específica del hongo.
- 1981: El ketoconazol se consolida como la primera droga del grupo de los azoles que administrada por vía oral era efectiva en el tratamiento de la histoplasmosis.
- 1982: Sharma y cols. emplean por primera vez la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-*H. capsulatum*.
- 1986: Wheat y cols. establecen un método para la detección de antígeno polisacárido de *H. capsulatum* mediante técnicas de alta sensibilidad: radioinmunoensayo y ELISA.
- 1987: La forma diseminada progresiva se hace relativamente común en el curso del SIDA. La histoplasmosis se reconoce como una de las infecciones oportunistas marcadoras que definen al SIDA
- En la década de los '90 aparecen otras drogas, particularmente del grupo de los triazoles que demuestran su efectividad para el tratamiento de la histoplasmosis.

Anexo 2. Formas clínicas más frecuentes de la histoplasmosis (Rippon, 1988; Torres Rodríguez, 1991; Bonifaz, 2000).

HISTOPLASMOSIS 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. El comienzo es súbito; hay agrandamiento hilar y del mediastino. Se puede presentar eritema nudoso y multiforme. La radiografía de torax puede mostrar la presencia de un infiltrado local con linfadenopatía que posteriormente puede calcificarse. Los síntomas pueden desaparecer espontáneamente antes de las tres semanas. En algunos casos la enfermedad toma una forma grave donde todos los signos anteriores se agudizan e incluyen fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso, cianosis leve y hemoptisis. En estos últimos pacientes se hace necesaria la terapia antimicótica. Esta es la forma de presentación de la mayoría de los casos asociados con brotes epidémicos en nuestro país.

HISTOPLASMOSIS PROGRESIVA DISEMINADA:

Afecta a niños y a personas de edad avanzada, causando una enfermedad casi siempre mortal. Resulta curioso destacar que el primer diagnóstico *pre-mortem* de histoplasmosis fue realizado en un niño de 6 meses de edad. Las edades tempranas se consideran un factor predisponente para esta forma clínica de la enfermedad en el huésped inmunocompetente. En estos casos la histoplasmosis se presenta como una infección pulmonar aguda de rápida diseminación a varios órganos, llegando a causar la muerte en la mayoría de los casos debido a fallo respiratorio, hemorragia digestiva, coagulación intravascular diseminada o sepsis bacteriana.

En los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) generalmente adopta una forma observada con poca frecuencia antes del surgimiento de esa pandemia viral y

que se considera equivalente a la progresiva diseminada fulminante del niño. Se caracteriza 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. La respuesta al tratamiento con anfotericina B es pobre. Con frecuencia se observa en el frotis de médula ósea y sangre periférica la presencia de una gran cantidad de levaduras. Los síntomas pulmonares son ligeros y pueden variar de normales a infiltrados miliares difusos, infiltrados lobulares o adenopatía hiliar.

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. Generalmente en estos pacientes la gravedad de la enfermedad es proporcional a la deficiencia de la inmunidad mediada por células. El cuadro se caracteriza por hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía generalizada, anorexia, pérdida de peso y fiebre. En algunos casos se afecta un solo órgano o sistema: endocarditis, pericarditis, meningitis o enfermedad de Addison. Una de las formas más características consiste en la ulceración de la lengua, paladar, epiglotis o laringe. En estos casos los síntomas más frecuentes son dolor, ronquera y disfagia y son poco frecuentes las hemorragias. Aunque con menos frecuencia, también se han reportado ulceraciones en la mucosa genital. En áreas endémicas la infección es exógena; sin embargo, en otros casos se ha sugerido la posibilidad de una reactivación endógena a partir de alguna antigua infección latente.

HISTOPLASMOSIS PULMONAR CRÓNICA:

Esta es una forma clínica que se desarrolla en el adulto, varón, entre la tercera y la cuarta década de la vida, residente en áreas endémicas. Constituyen factores predisponentes el hábito de fumar y los defectos anatómicos preexistentes. Más del 90 % de los pacientes dan

resultados positivos en las pruebas que detectan anticuerpos anti-*Histoplasma capsulatum* (inmunoprecipitación, fijación del complemento). Estos pacientes pueden responder favorablemente al tratamiento con anfotericina B; sin embargo, si la enfermedad pulmonar de base continúa su avance, el tratamiento antimicótico resulta ineficiente. Los síntomas iniciales son: tos productiva, posibles hemoptisis, disnea y eventualmente otros signos de enfermedad respiratoria crónica (pérdida de peso, inanición, disnea, cianosis). Las lesiones cavernosas de los campos pulmonares superiores son generalmente bilaterales.

HISTOPLASMOSIS CUTÁNEA PRIMARIA:

Es una enfermedad que se presenta con muy baja frecuencia (0.5 %). En estos casos 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 de campo (recolección de guano, limpieza de gallineros, etc.) o trabajos de laboratorio. Se desarrolla una úlcera indolora, chancriforme con adenitis regional. Las lesiones pueden involucionar hasta resolver espontáneamente a los pocos meses, aunque en otros casos pueden progresar crónicamente con compromiso de los linfáticos de drenaje.

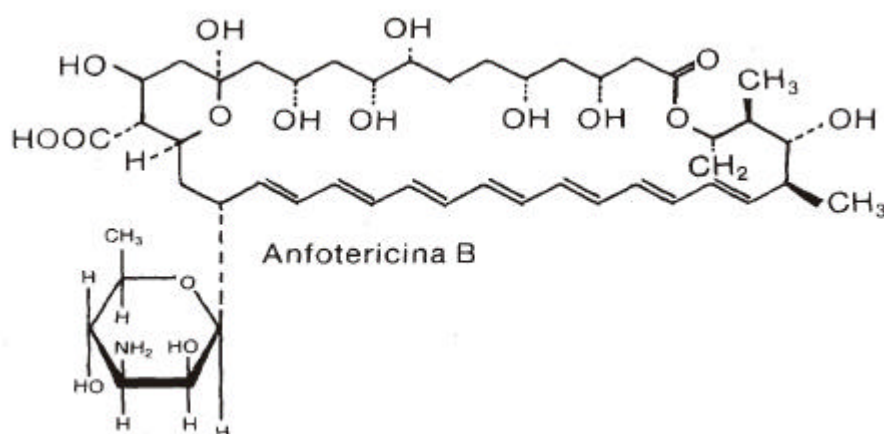
HISTOPLASMOMA:

Los histoplasmosas 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.

Anexo 3: Principales drogas antifúngicas utilizadas en el tratamiento de la histoplasmosis.

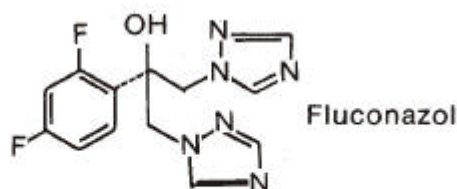
ANFOTERICINA B (FUNGIZONE). La anfotericina B es un compuesto poliénico anfotérico, obtenido mediante procesos fermentativos a partir de *Streptomyces nodosus*; es insoluble en agua y soluble en compuestos orgánicos como el dimetilsulfóxido. Su actividad puede ser fungicida o fungistática, en dependencia de su concentración y de la sensibilidad del microorganismo, su actividad óptima se alcanza a valores de pH entre 6,0 y 7,5 (Gallis *et al.*, 1990).

La anfotericina B ha demostrado tener buena actividad contra una gran variedad de hongos patógenos, incluyendo *H. capsulatum*. Su mecanismo de acción se basa en su interacción con los esteroides de las membranas celulares de las células eucarióticas, causando la desestabilización de las mismas; sin embargo, la unión al ergosterol resulta más fuerte que su afinidad por el colesterol de las células de mamíferos, lo que constituye la base de su toxicidad selectiva (Brajtburg *et al.*, 1990; Gallis *et al.*, 1990). Las presentaciones lipídicas han permitido iniciar tratamientos con dosis altas y sostenidas, con una más rápida recuperación del paciente, aunque su elevado costo ha limitado su uso (Velasco-Castrejón, 1998; Negroni, 2001).



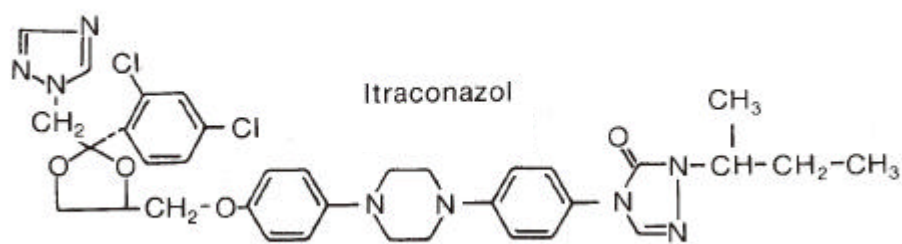
FLUCONAZOL (DIFLUCAN). Pertenece al grupo de los triazoles, cuya actividad antifúngica es superior a la de los imidazoles. Está indicado en aquellas micosis causadas por levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*, aunque también ha tenido éxito en el tratamiento de aspergilosis y coccidioidomicosis. En modelos animales es el derivado azólico más potente contra *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Histoplasma* (Bennett, 1990; Arenas, 1993).

Su acción fungistática es semejante a la de otros compuestos azólicos, basándose en la inhibición de la enzima 14- α -demetilasa del citocromo P450 que interviene en la síntesis del ergosterol. También induce cambios en la estructura y función de la membrana celular, incluidos su permeabilidad y la alteración de todo el sistema de enzimas (Vanden Bossche *et al.*, 1994; Vanden Bossche *et al.*, 1998). El fluconazol se considera menos tóxico que el ketoconazol y los efectos colaterales adversos han sido poco frecuentes (Bennett, 1990; Arenas, 1993).



ITRACONAZOL (SPORANOX). Es otro derivado triazólico muy usado en la actualidad. Tiene un amplio espectro antifúngico y es más activo que el ketoconazol *in vitro* frente a la mayoría de los hongos patógenos, incluyendo *H. capsulatum* y las especies de *Aspergillus* resistentes a otros compuestos azólicos (Arenas, 1993).

Su acción es fungicida, actuando sobre la enzima 14- α -demetilasa dependiente del citocromo P450. En el caso particular de *H. capsulatum* y *C. neoformans* el itraconazol actúa sobre un segundo blanco, la enzima 3-ketosterol reductasa, dando lugar a una acumulación del 3-ketosteroide y la consecuente desestabilización de la membrana celular (Vanden Bossche *et al.*, 1998). Pueden presentarse efectos adversos en el 3-8 % de los casos (Arenas, 1993).



Anexo 4. Nombre y localización de las cuevas y otros hábitats estudiados en la búsqueda de *H. capsulatum*.

PINAR DEL RÍO

- Tres cuevas en la zona turística de Viñales, conocidas como Cueva del Indio, Cueva del Cable y Cueva de San Miguel.
- Dos cuevas en la península de Guanahacabibes: Carabelita I y Carabelita II.
- Cinco cuevas ubicadas en la base de campismo "Cueva de los Portales", en el municipio La Palma: Cueva del Espejo, Cueva Oscura, Cueva Estrecha, Cueva Los Tainos y Cueva de los Portales.
- Cueva de Eulogio, municipio Pinar del Río

LA HABANA:

- Cinco cuevas en la región de Boca de Jaruco: Cueva de Don Martín, Cueva del Vaho, Cueva de los Murciélagos, Cueva del Majá y Cinco Cuevas.
- Cinco cuevas en la zona del litoral norte habanero, en áreas ubicadas en bases de campismo popular de Jibacoa y Puerto Escondido.
- Una cueva cercana a la localidad de Ocegüera, en el municipio de Artemisa.
- Un túnel abandonado en zona rural del municipio de Mariel.
- Tres cuevas en la localidad de Zaragoza, en el municipio de San José de las Lajas, conocidas como: Cueva de la Virgen, Cueva de los Murciélagos y Cueva del Yunque.
- Cueva de la Loma de Candela, municipio de Güines.
- Cueva del Indio, en Tapaste, San José de las Lajas.
- Cueva Grande de Baracoa, municipio Bauta.
- Cueva de Sandoval, Vereda Nueva, municipio de Caimito.

MATANZAS:

- Cueva de La Pluma, municipio Matanzas.
- Una cueva en el municipio Calimete.

GRANMA:

- Una cueva en el municipio Bayamo

ISLA DE LA JUVENTUD:

- Ocho cuevas en las proximidades de Nueva Gerona, capital municipal, conocidas como: Cueva del Abra, Cueva de la Higuera, Cueva del Agua, Cueva de las Golondrinas, Cueva del Farallón, Cueva del XX Aniversario, Cueva del Abono y Cueva de la Lechuza.
- Tres cuevas en la costa sur de la Isla, en una zona rural cercana al poblado de Cocodrilos: Cueva de Cocodrilos, Cueva de los Murciélagos, en Punta de Pedernales y Cueva de Carapachibey, en las proximidades del faro del mismo nombre.
- Gruta Grande de Santa Isabel, en la zona centro-este.
- Cueva de la Siguanea, en la zona centro-oeste.
- Cuatro cuevas en la zona de Punta del Este, en el extremo oriental de la Isla de la Juventud, en un área de interés turístico y arqueológico, alejada de los centros urbanos. Estas cuevas se encuentran numeradas del 1 al 4 (Núñez Jiménez, 1980).
- Cueva de Cayamas.

OTROS HÁBITATS:

- Gallineros: Tres gallineros domésticos en el poblado de Cocodrilos y dos en la zona de Maniadero, en el centro-oeste de la isla, además de una granja avícola en Nueva Gerona.
- Una construcción abandonada en la carretera de Júcaro, en la parte oriental formada por paredes de bloques, en cuyo interior habitaban murciélagos.
- Interior de troncos de palmas "barrigonas" (*Colpothrinax wrightii*).

Anexo 5. Metodología para el procesamiento de muestras de tierra para el aislamiento de *H. capsulatum* (Font D'Escoubet *et al.*, 1975; Taylor *et al.*, 1994).

1. Recogida de las muestras: De cada sitio que se desee estudiar se debe recoger más de una muestra consistente en tierra (100-200 g), conteniendo excretas de guano de murciélagos o aves. Las muestras deben recogerse en recipientes estériles y trasladadas al laboratorio antes de las 72 horas.
2. Al llegar al laboratorio las muestras deben ser almacenadas en refrigeración (4 °C) durante 24 horas.
3. Examen microscópico directo: A cada una de las muestras se le debe realizar una observación microscópica directa con lactofenol-azul de algodón.
4. Preparación de las muestras: Se toman dos gramos de cada muestra y se le añaden 18 mL de solución salina estéril con antibióticos (penicilina, 8 000 U/mL; estreptomicina, 2 mg/mL) para obtener una dilución aproximada de 1:10. Las suspensiones así obtenidas se agitan en *Vortex* durante un minuto, se dejan reposar durante una hora y finalmente, el sobrenadante se recoge en tubos estériles.
5. Inoculación en ratones: Con cada suspensión se inoculan 10 ratones machos jóvenes BALB/c (1 mL, vía intraperitoneal). A las cuatro semanas se sacrifica la mitad de los animales y a las 8 semanas el resto.
6. Procesamiento de las vísceras de los ratones: Fragmentos de hígado y bazo de cada animal se maceran y se siembran separadamente en tubos con agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y cicloheximida, y se incuban a 28 °C durante 8 semanas antes de considerarlos negativos.
7. Aislamiento e identificación de *H. capsulatum*: Los tubos sembrados deben revisarse tres veces por semana en busca de colonias algodonosas, de color blanco o pardo claro. De cada colonia se realizan preparaciones con lactofenol-azul de algodón para la observación microscópica de los macroconidios tuberculados típicos de *H. capsulatum*. Posteriormente, las colonias con tales características son transferidas a sendos tubos con

agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y agar Sabouraud glucosado sin antibióticos y se procede a su identificación de acuerdo a sus características morfológicas (Rippon, 1988; De Hoog y Guarro, 1995; Lacaz *et al.*, 1998). La confirmación de la identidad de las cepas obtenidas se realiza mediante la conversión a fase levaduriforme en el medio de agar infusión de cerebro y corazón con cisteína (1%) y la prueba de exoantígenos.

Anexo 6. Cepas controles utilizadas en la prueba de exoantígenos.

Especies	Procedencia de las cepas		Total
	IP	INHRR	
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1052	30.749 480	3
<i>Histoplasma duboisii</i>	82050	-	1
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	-	307 31.996 32.065	3
Total	2	5	7

IP: Instituto Pasteur de París, Francia.

INHRR: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, Caracas, Venezuela.

Anexo 7. Metodología para la conversión a fase levaduriforme de los cultivos de *H. capsulatum* (Koneman y Roberts, 1987).

1. Siembra de las cepas agar Sabouraud glucosado sin antibióticos. Incubar a 28 °C durante 7-10 días.
2. Resembrar un fragmento de la colonia filamentosa en tubos con agar infusión de cerebro y corazón con cisteína (1%) e incubar a 37 °C.
3. A las 24 horas añadir a cada tubo 1 mL de caldo infusión de cerebro y corazón e incubar a 37 °C durante 7 días.
4. Revisar diariamente los cultivos e inclinar ligeramente los tubos para humedecer toda la superficie del medio.
5. Trasferir semanalmente cada cultivo a un nuevo medio fresco hasta lograr la total conversión a levaduras.
6. Verificar mediante la observación microscópica de los cultivos con lactofenol-azul de algodón.

Anexo 8. Procesamiento de las muestras de esputo para aislamiento de *H. capsulatum* (Balows y Hausler, 1981).

A) Siembra directa:

1. Añadir a la muestra de esputo igual volumen (5-10 mL) de una solución recién preparada de N-acetil-L-cisteína como agente mucolítico.
2. Mezclar en *vortex* durante 10 segundos.
3. Hacer un frotis y colorear por la técnica de Giemsa y observar al microscopio.
4. Añadir penicilina (20 U/mL) y estreptomicina (40 U/mL). Mezclar bien.
5. Inocular 0.1 mL del sedimento en el medio de aislamiento primario (agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y cicloheximida a 28 °C y agar infusión de cerebro y corazón con cisteína (1%) a 37 °C).
6. Incubar hasta 8 semanas antes de considerarlos negativos. Examinar los cultivos cada 2-3 días.
7. Identificar los cultivos aislados mediante características culturales y micromorfológicas, dimorfismo y prueba de exoantígenos.

B) Inoculación en ratones:

1. Inocular 0.5-1 mL de la muestra de esputo por vía intraperitoneal en ratones BALB/c, machos, adultos jóvenes (18-20 g de peso).
2. Inocular tres ratones por muestra.
3. Sacrificar los ratones entre la 2ª y la 4ª semanas.
4. Tomar hígado y bazo de cada animal y macerar con perlas de vidrio en una pequeña cantidad de solución salina fisiológica estéril.
5. Sembrar paralelamente en agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y cicloheximida.
6. Incubar a 28 °C durante 8 semanas antes de considerarlos negativos.
7. Identificar los cultivos aislados mediante características culturales, micromorfológicas, dimorfismo y prueba de exoantígenos.

































































































Anexo 9. Preparación de las diluciones de antifúngicos y su distribución en las placas de microensayo (Fernández Andreu *et al.*, 1998).

1. Preparar soluciones "madre" de anfotericina B, ketoconazol e itraconazol en dimetilsulfóxido (DMSO) y de fluconazol en agua destilada estéril, con una concentración de 2 mg/mL.
2. Tomar 640 μ L de cada solución madre y añadir 360 μ L de agua destilada estéril, para obtener diluciones de 1280 μ g/mL de cada una de las cuatro drogas.
3. Repartir con pipeta multicanal 20 μ L de agua destilada estéril en cada uno de los 96 pocillos de cada placa.
4. Tomar 20 μ L de la solución de 1280 μ g/mL y añadir en los pocillos de la columna 2 y realizar diluciones dobles hasta la columna 11, resuspendiendo varias veces en cada pocillo, de manera que se obtenga la siguiente distribución:
 - Columnas 1 y 12: 20 μ L de agua destilada estéril
 - Columnas 2-11: 20 μ L de concentraciones decrecientes de cada droga.

Anexo 10. Inoculación de las suspensiones de *H. capsulatum* en las placas de microensayo (Fernández Andreu *et al.*, 1998).

1. De las suspensiones de inóculos preparadas, distribuir 180 μ L por pocillo desde la columna 12 hasta la 2, realizándose por duplicado para cada cepa.
2. La gama final de concentraciones, después de añadido el inóculo estará entre 64 μ g/mL en los pocillos de la columna 2 y 0.125 μ g/mL en los de la columna 11.
3. En la columna 1, distribuir 180 μ L de medio de cultivo estéril (sin inocular), quedando como control negativo de crecimiento, para verificar posibles contaminaciones.
4. En la columna 12 no se añade droga, quedando como control positivo de crecimiento.
5. El volumen total de cada pocillo es de 200 μ L.
6. La distribución final se muestra en el esquema (anexo 12).

Anexo 11: Esquema de la placa utilizada para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0
		(µg/mL)										

Columna 1: Medio de cultivo estéril (180 µL de medio de cultivo + 20 µL de agua destilada).

Columna 2: Mayor concentración del antifúngico (64 µg/mL).

Columna 11: Menor concentración del antifúngico (0.125 µg/mL).

Columna 12: Control de crecimiento (180 µL de medio de cultivo inoculado + 20 µL de agua destilada).

Anexo 12. Medios de cultivo y soluciones amortiguadoras utilizados.

1. AGAR SABOURAUD GLUCOSADO (modificación de Emmons)

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Ajustar pH a 6.8-7.0. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

2. AGAR SABOURAUD CON CLORANFENICOL

Añadir al medio anterior 50 mg de cloranfenicol previamente disuelto en 5 mL de etanol absoluto y esterilizar en autoclave.

3. AGAR SABOURAUD CON CLORANFENICOL Y CICLOHEXIMIDA

Añadir al agar Sabouraud glucosado 50 mg de cloranfenicol previamente disuelto en 5 mL de etanol absoluto y 500 mg de cicloheximida previamente disuelta en 2 mL de acetona y esterilizar en autoclave

4. AGAR INFUSIÓN DE CEREBRO Y CORAZÓN CON CISTEÍNA

Agar infusión de cerebro y corazón (OXOID)	47 g
Cisteína	1 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH a 7,4. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

5. MEDIO DE SMITH

L-asparagina	7,0 g
Cloruro de amonio	7,0 g
Fosfato dibásico de potasio (anhidro)	1,31 g
Citrato trisódico . 2H ₂ O	0,74 g
Sulfato de magnesio . 7H ₂ O	1,50 g
Citrato férrico	0,30 g
Dextrosa	10,0 g

Glicerina	25,0 g
Agua destilada, c.s.p.	1000 mL

Disolver la asparagina en 300 mL de agua destilada (50 °C). Disolver las sales por separado en 25 mL de agua. El citrato férrico disolver en agua caliente. A la solución de asparagina, añadir las sales en el orden en que aparecen. Añadir dextrosa y glicerina y completar el volumen con agua. Esterilizar a 115 °C por 25 minutos.

6. MEDIO RPMI-1640 (SIGMA)

Medio sintético recomendado para las pruebas de susceptibilidad antifúngica, con glutamina, sin bicarbonato y con rojo fenol como indicador de pH. Debe ser ajustado a pH 7,0 a 25 °C con MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfónico) (SIGMA) (concentración final 0.165 mol/L).

7. AGAR PAPA DEXTROSA

Agar papa dextrosa (OXOID)	39 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar pH a $5,6 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

8. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA-FOSFATOS

NaCl	8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 mL

Agua destilada c.s.p.	1000 mL	Ajustar pH 7,4.
-----------------------	---------	-----------------

9. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA CARBONATO-BICARBONATO

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g

Agua destilada c.s.p.	1000 mL	Ajustar pH 9,6.
-----------------------	---------	-----------------

10. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATO-CITRATO

Ácido cítrico	5,1 g	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9,15 g	
Agua destilada c.s.p.	1000 mL	Ajustar pH 5,0

Anexo 13. Algunas características importantes de las especies de murciélagos de las cuales se ha aislado *Histoplasma capsulatum* en Cuba (Silva Taboada, 1979).

Artibeus jamaicensis parvipes: Ampliamente distribuido en todo el archipiélago cubano. Vive principalmente en cuevas y en el follaje y troncos huecos de grandes árboles. También puede encontrarse en estructuras arquitectónicas y escasamente en minas abandonadas. No forma colonias mixtas con otras especies. Es una especie frugívora conocida también como *el murciélago frutero del Caribe*. No se descarta la posibilidad de que también se alimente de néctar, polen e insectos.

Tadarida brasiliensis muscula: Habita en todo el territorio nacional, aunque escaso en la Isla de la Juventud. Su refugio principal son las cuevas y la algunas edificaciones, ocasionalmente en árboles huecos. Se alimenta exclusivamente de insectos.

Brachyphylla nana nana: Esta especie se concentra principalmente en la región occidental, aunque existen poblaciones pequeñas en otras regiones del país. Se encuentra en cámaras y galerías cavernarias húmedas y abrigadas. Se alimenta del polen, insectos y pequeñas semillas. Se considera una especie *intranquila y escandalosa*, capaz de causar heridas serias con su mordida. Puede vivir en colonias mixtas.

Eptesicus fuscus dutertrei: Se distribuye principalmente en las regiones central y occidental. Su refugio son las cuevas y estructuras arquitectónicas, en las partes más frescas y ventiladas. Es una especie insectívora.

Mormoops blainvillei: Se puede encontrar en todo el territorio nacional. Su refugio principal son los techos de las casas, donde puede formar colonias mixtas. Especie insectívora.

Macrotus waterhousei minor: Se distribuye por todo el país. Su principal refugio son las cuevas, ocasionalmente las minas y almacenes. Se alimenta exclusivamente de insectos.

Anexo 14. Casos de histoplasmosis publicados en la literatura médica nacional agrupados según edad, sexo y raza.

Grupos de edades	Totales	Sexo		Raza			
		M	F	B	N	M	NI
< 10 años	3	2	1	2	0	1	0
10-20 años	5	5	0	3	0	1	1
21-30 años	10	9	1	7	1	0	2
31-40 años	7	6	1	6	1	0	0
41-50 años	1	1	0	1	0	0	0
51-60 años	5	4	1	5	0	0	0
> 60 años	2	2	0	2	0	0	0
NI	16	16	0	-	-	-	16
Total	49	45	4	26	2	2	19

B: Blanca; N: Negra; M: Mestiza; NI: No informado

Fuente: Datos del presente trabajo; Sanguily *et al.*, 1951; Barquet *et al.*, 1951; Jiménez Jiménez y Taquechel Tusiente, 1965; Delgado Fernández y Santana Garay 1978; Pila Pérez *et al.*, 1980; Suárez Hernández *et al.*, 1985; Font D'Escoubet *et al.*, 1985; González Menocal *et al.*, 1985; Collazo Caballero y Ochoa, 1986; Sastre de la Peña *et al.*, 1987; Pérez Lozano *et al.*, 1988; Cisneros Despaigne *et al.*, 1989; González Ibarzábal *et al.*, 1990; Capó de Paz *et al.*, 1990; Millán Marcelo *et al.*, 1990; Rodríguez Barreras *et al.*, 1992; Leng Díaz *et al.*, 1992; Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996.

Anexo 15. Formas clínicas de los casos de histoplasmosis informados en la literatura médica nacional.

Forma clínica (n)	Diagnosticado por:				
	Cultivo	Histología	Serología	Clínica	Prueba cutánea
Pulmonar Aguda (15)	2*	2	13	15	5
Pulmonar crónica (1)	1	-	-	1	-
Diseminada (33)	16	29	8	33	3
Total (49)	19	31	21	49	8

*: 10 casos no informados

Fuente: Datos del presente trabajo; Sanguily *et al.*, 1951; Barquet *et al.*, 1951; León Blanco *et al.*, 1952; Jiménez Jiménez y Taquechel Tusiente, 1965; Delgado Fernández y Santana Garay 1978; Pila Pérez *et al.*, 1980; Font D'Escoubet *et al.*, 1985; González Menocal *et al.*, 1985; Suárez Hernández *et al.*, 1985; Pérez Lozano *et al.*, 1988; Cisneros Despaigne *et al.*, 1989; Millán Marcelo *et al.*, 1990; Capó de Paz *et al.*, 1990; Leng Díaz *et al.*, 1992; Rodríguez Barreras *et al.*, 1992; Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996.

Anexo 16. Distribución por provincias de los casos de histoplasmosis informados en la literatura médica (incluidos los brotes epidémicos).

Provincias	No. de casos
Pinar del Río	153
La Habana	247
Ciudad de la Habana	258
Matanzas	528
Isla de la Juventud	2
Villa Clara	151
Sancti Spíritus	9
Cienfuegos	280
Ciego de Avila	70
Camagüey	13
Las Tunas	7
Holguín	4
Granma	1
Santiago de Cuba	29
Guantánamo	3
Total	1755

Fuente: Datos del presente trabajo; Nocado Pous *et al.*, 1965; Grupo Epidemiológico Central de las FAR, 1966; Chang Puga y Font D'Escoubet, 1974; De Armas *et al.*, 1978; González Ochoa, 1983; Montoya Batista, 1988; Almeyda *et al.*, 1988; González Menocal *et al.*, 1990; Fernández Andreu y Martínez Machín, 1996.

Anexo 17. Resultados de las encuestas de histoplasmina realizadas en el país según los grupos poblacionales.

Grupo poblacional	Porcentaje de positividad
Militares *	75.6 ^(a) ; 24 ^(a) ; 70 ^(b) ; 89 ^(c) ; 92.8 ^(d) ; 93 ^(e) ; 80 ^(f)
Recolectores de guano	37.5 ^(m)
Estudiantes **	16.6 ^(g) ; 57.6 ^(h) ; 27 ^(h)
Trabajadores avícolas	28.8 ^(g) ; 29 ⁽ⁱ⁾ ; 28.8 ^(j) ; 17.5 ^(k)
Pacientes hospitalizados	20.5 ^(l) ; 14 ⁽ⁱ⁾
Campesinos	15.5 ^(ll)
"Tuberculosos" ***	4.7 ^(ll) ; 6.9 ^(ll) ; 3.4 ^(g) ; 9 ⁽ⁱ⁾
Niños	0 ^(g)
Población general	18 ⁽ⁱ⁾ ; 13.2 ^(j) ; 12.5 ^(k)

*Militares expuestos en cuevas; ** Estudiantes de escuelas secundarias rurales;

*** Pacientes de sanatorios antituberculosos.

Fuente: Se incluyen datos de trabajos no publicados, presentados como Trabajos de Terminación de Residencia (TTR). a) Nocedo Pous *et al.*, 1965; b) Paniagua, (TTR), 1970; c) Chang Puga y Font D'Escoubet, 1974; d) Leyva Urquiza, TTR, 1974; e) Paneca, TTR, 1975; f) Bataille, TTR, 1982; g) Menéndez del Dago, TTR, 1968; h) De Armas Pérez *et al.*, 1978; i) Valdés, TTR, 1975; j) Suárez Hernández *et al.*, 1992; k) Fernández Andreu *et al.*, 1994; l) Pardo *et al.*, 1952; ll) Fuentes y Madiedo, 1960; m) Castillo Méndez *et al.*, 1988.