



Original

Brote de histoplasmosis en la provincia de Neuquén, Patagonia Argentina

Liliana María Calanni^a, Rufina Ana Pérez^a, Susana Brasili^a, Norma Graciela Schmidt^a,
Cristina Adela Iovannitti^b, María Fernanda Zuiani^c, Ricardo Negróni^b,
Jorge Finquelievich^b y Cristina Elena Canteros^{c,*}

^a Hospital Provincial Neuquén Dr. Eduardo Castro Rendón, Neuquén Capital, Provincia de Neuquén, Argentina

^b Centro de Micología, IMPAM, CONICET-UBA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Micología, INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 18 de julio de 2012

Aceptado el 20 de diciembre de 2012

On-line el 9 de febrero de 2013

Palabras clave:

Histoplasma capsulatum

Histoplasmosis

Brote

Argentina

RAPD-PCR

R E S U M E N

Antecedentes: La República Argentina no registra casos autóctonos de histoplasmosis en regiones australes del país.

Objetivo: Informar de un brote de histoplasmosis ocurrido en Zapala, Provincia de Neuquén, Patagonia Argentina.

Métodos: Se evaluó el cuadro clínico y las características epidemiológicas de 5 pacientes involucrados en el brote. Se realizaron estudios ambientales para conocer la fuente de infección. Se analizó el perfil genético generado por RAPD-PCR con los primers 1281-1283 de los aislamientos de *Histoplasma capsulatum* del caso índice (CI) y se comparó con cepas de origen clínico no relacionadas con el brote.

Resultados: Los pacientes residían en Zapala y no habían visitado otras áreas geográficas. Todos presentaron un síndrome gripal con imágenes radiológicas micronodulillares diseminadas. El CI necesitó tratamiento específico por la gravedad de su cuadro clínico, y los 4 pacientes restantes presentaron una sintomatología leve y no fueron tratados. La evolución clínica de todos fue favorable. Las cepas de *H. capsulatum* aisladas de hemocultivo y biopsia pulmonar del CI presentaron un perfil genético diferente al resto de las cepas analizadas. La presencia del hongo en el ambiente pudo inferirse mediante la detección de anticuerpos anti-*Histoplasma* en suero de ratones BALB/c inoculados con tierra de una alcantarilla que los trabajadores removieron después de un aluvión.

Conclusiones: Este brote extiende el área endémica de histoplasmosis por debajo del paralelo 38° de latitud sur. El diagnóstico de histoplasmosis debe considerarse en pacientes de Neuquén, con síntomas compatibles con esta micosis, aun sin existir antecedentes epidemiológicos de viajes a áreas endémicas.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Outbreak of histoplasmosis in province of Neuquén, Patagonia Argentina

A B S T R A C T

Background: In Argentina, there are no reports of autochthonous cases of histoplasmosis in the southern regions of the country.

Aim: To report a histoplasmosis outbreak in Zapala town, Province of Neuquén, Patagonia Argentina.

Methods: We evaluated the clinical and epidemiological characteristics of 5 patients involved in the outbreak. Environmental studies were conducted to determine the source of infection. The genetic profile of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from the index case (IC) were compared with clinical isolates from Argentinean patients not related to the outbreak, using RAPD-PCR with primers 1281-1283.

Results: The patients were residents of Zapala, and had not visited other geographical areas before. All patients had an influenza-like syndrome, and X-ray revealed disseminated micronodular images throughout the lung parenchyma. The IC needed specific antifungal therapy; the remaining 4 patients had mild symptoms, and did not require therapy. All of them had a good clinical outcome. Strains of *H. capsulatum* isolated from blood culture and lung biopsy of the IC showed a genetic profile different from other strains

Keywords:

Histoplasma capsulatum

Histoplasmosis

Outbreak

Argentina

RAPD-PCR

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: cconteros@anlis.gov.ar, cecanteros@gmail.com (C.E. Canteros).

analyzed. The presence of the fungus in the environment was demonstrated by the detection of anti-Histoplasma antibodies in BALB/c mice inoculated with soil obtained in a culvert where workers had dug up earth after a landslide.

Conclusions: This outbreak suggests the histoplasmosis endemic area is under the 38° S parallel. Patients from Neuquén, Patagonia Argentina, with compatible symptoms of histoplasmosis should be tested, regardless of their travel or exposure history.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La histoplasmosis es una micosis endémica producida por el hongo termodimorfo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Aunque es una micosis cosmopolita, las áreas endémicas más importantes se sitúan en el continente americano, en zonas con climas templados, precipitaciones anuales alrededor de 1.000 mm y humedad relativa entre 67 y 87%³.

La infección se inicia con la inhalación de microconidios que el hongo produce en la naturaleza asociado a los excrementos de aves y de murciélagos¹³. El período de incubación es de aproximadamente 15 días. La primoinfección puede ser asintomática o presentar manifestaciones clínicas similares a un síndrome gripal que se autolimita; estas ocurren en aproximadamente el 95% de los casos, y solo deja calcificaciones residuales en los pulmones, los ganglios linfáticos y el bazo. Las formas clínicas de la histoplasmosis progresiva son: pulmonar crónica en pacientes inmunocompetentes con EPOC, diseminada crónica en adultos mayores con inmunodepresión leve, y las diseminadas aguda y subaguda en los que padecen inmunodepresión grave. La gravedad de la enfermedad depende del inóculo fúngico, del estado inmunitario y de la edad del huésped¹².

Los brotes epidémicos de histoplasmosis ocurren por exposición a una fuente común con altas concentraciones de conidios. En general, se asocian a actividades laborales o recreativas, tales como limpieza de parques, demolición de edificios, visitas a cavernas o cuevas, entre otras. Estas epidemias ocurren principalmente en el sureste de Estados Unidos, México, Venezuela, Brasil, países de Centroamérica y en viajeros que visitan estas áreas geográficas³.

En Argentina, el área endémica de la histoplasmosis abarca las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba, este de La Pampa, sur de Salta, norte de Tucumán, norte de Corrientes, y este y centro de Chaco^{14-16,19,23,24,28}. Por el momento, no se han documentado casos autóctonos en las provincias patagónicas y el brote epidémico más austral notificado en la literatura revisada corresponde a uno ocurrido recientemente en una base aérea de Morón, Provincia de Buenos Aires¹⁸.

El objetivo de este trabajo es describir las características epidemiológicas de un brote de histoplasmosis ocurrido cerca de la ciudad de Zapala, Provincia de Neuquén, Patagonia Argentina.

Materiales y métodos

Pacientes

El 18 de agosto de 2002 ingresó en el Hospital Interzonal Zapala un paciente (caso índice) de 33 años, de sexo masculino, con antecedentes de mialgias de una semana de evolución, fiebre, escalofríos, cefalea intensa, dolor retroocular, malestar general, hipoxemia grave y una placa radiográfica de tórax con infiltrados pulmonares bilaterales. Debido a la gravedad del cuadro clínico del paciente, este y otras 3 personas con síntomas similares fueron derivados a un centro de mayor complejidad, el Hospital Provincial Neuquén (HPN), de la ciudad de Neuquén, República Argentina.

En el HPN, los 4 pacientes derivados fueron reevaluados clínicamente; se realizaron placas radiográficas, tomografía axial computarizada (TAC) de tórax, estudios generales de laboratorio,

urocultivo, hemocultivo para gérmenes comunes y para hongos. Como los pacientes removían tierra e incluso podían haber estado en contacto con roedores, se les realizó un diagnóstico diferencial de patologías endémicas de la zona geográfica, como coccidioidomycosis y hantaviriosis pulmonar, así como de otras enfermedades con síntomas neumónicos. Se solicitaron reacciones cutáneas y estudios serológicos para diagnóstico de micosis profundas, prueba de la tuberculina, estudios para diagnóstico de leptospirosis, neumonía por *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y hantaviriosis.

Los pacientes comenzaron un tratamiento con antibióticos y al caso índice, por su mala evolución, se le realizó una biopsia pulmonar que se remitió al Servicio de Anatomía Patológica y al sector de Microbiología del Laboratorio para estudios histopatológicos y microbiológicos, respectivamente.

Un quinto paciente, compañero de tareas laborales, fue citado y evaluado de forma ambulatoria una semana después. Los 5 pacientes fueron sometidos a un interrogatorio sobre antecedentes de relevancia (personal, familiar y ambiental), lugares visitados, trabajos realizados, hábitos de esparcimiento y contactos con animales.

Un sexto trabajador, con similar sintomatología y que conformaba el grupo, se negó a ser evaluado.

Estudios ambientales

En septiembre de 2002, y con un diagnóstico presuntivo de histoplasmosis, un primer grupo interdisciplinario realizó la búsqueda de la fuente de infección en los lugares donde los trabajadores desarrollaron actividades. La investigación consistió, en primer lugar, en una inspección visual de los lugares geográficos y selección de los sitios de toma de muestras según características acordes al hábitat natural de *H. capsulatum*. Una vez elegido el sitio, se limpió la capa superior de la tierra suelta (aproximadamente 1 cm) y se tomó el suelo de entre 5 y no más de 10 cm de profundidad. La colecta se realizó en: a) un terreno cercano a un basural al norte de Zapala; b) una alcantarilla aluvional en el km 22 de la ruta 40 entre Zapala y Las Lajas, donde los trabajadores refirieron haber removido escombros; c) una zona aledaña al Cerro Cansino, donde los obreros habían removido piedras, y d) los alrededores de la laguna El Toro, 6 km al SO de Zapala. En diciembre de 2002, con el diagnóstico de certeza de histoplasmosis, se realizó una segunda búsqueda de *H. capsulatum* en el ambiente en zonas cercanas a Zapala con el fin de conocer el hábitat del hongo en la región. En esta oportunidad se recogieron muestras de suelo de cavernas y áreas sospechosas: a) zonas aledañas al espejo de agua del Parque Nacional Laguna Blanca; b) cavernas de Chenque Haichol, y c) caverna del Gendarme, perteneciente al sistema cavernario de Cuchillo Curá. Los sitios de recolección de suelo, la cantidad de muestras por sitio y las fechas de recolección se indican en la [tabla 1](#).

Además, se expusieron durante 8 h ratones BALB/c como centinelas de infección²⁷ en las cavernas Chenque Haichol (n=6) y Cuchillo Curá (n=9).

Un gramo de suelo se suspendió en 10 ml de tampón PBS (NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Na₂HPO₄ 1,5 g/L; KH₂PO₄ 0,24 g/L) pH 7,2, suplementado con gentamicina 100 mg/mL y cloranfenicol 250 mg/L. La suspensión se dejó sedimentar 15 min a temperatura

Tabla 1
Sitios de recolección de suelo, cantidad de muestras recogidas por sitio y fecha de la recolección

| Nombre del lugar | Coordenada geográfica/elevación (m) | Cantidad de muestras | Fecha de recolección |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Basural cercano a Zapala | 38° 54'S, 70° 05'O/1.040 | 5 | Septiembre 2002 |
| Alcantarilla ruta boca este | 38° 47'S, 70° 13'O/898 | 5 | |
| Alcantarilla boca oeste | 38° 47'S, 70° 13'O/898 | 7 | |
| Pie del Cerro Cansino | 38° 52'S, 70° 19'O/1.150 | 4 | Diciembre 2002 |
| Laguna del Toro | 38° 55'S, 70° 08'O/1071 | 2 | |
| Parque Nacional Laguna Blanca | 39° 02'S, 70° 24'O/1.290 | 7 | |
| Caverna de Chenque Haichol | 38° 36'S, 70° 40'O/1.100 | 1 | |
| Caverna del Gendarme | 38° 36'S, 70° 23'O/910 | 7 | |

ambiente y 100 µL del sobrenadante puro y diluido 1/10 se sembraron por duplicado en medios selectivos para aislamiento de hongos dimorfos: agar Sabouraud suplementado con antibióticos ASG-CC (glucosa 2%, peptona 1%, agar 1,5%, cicloheximida 0,004% y cloranfenicol 0,0025%) y ASG-CC suplementado con rosa de Bengala 0,002%. Los cultivos se incubaron a 25 °C en cámara húmeda y fueron revisados diariamente hasta los 40 días o hasta la aparición de colonias sospechosas; estas fueron subcultivadas y estudiadas en sus características macroscópicas y microscópicas¹³. Paralelamente, 0,5 mL del sobrenadante se inocularon vía intraperitoneal a 5 ratones BALB/c por cada muestra de tierra procesada.

Los ratones centinela (n = 15) y los inoculados con tierra (n = 190) fueron mantenidos en condiciones de bioseguridad, debidamente acondicionados, suministrándoles alimentos y agua *ad libitum* durante 50 días¹.

Previo extracción de una muestra de sangre, los animales fueron sacrificados según recomendaciones de la reglamentación para bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o de análisis para terceros de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica¹. Se separaron los sueros y en estos se realizó una búsqueda de anticuerpos anti-*H. capsulatum* utilizando contraelectroforesis (CIEF) e inmunodifusión doble (IDD) frente a suero y antígeno de referencia IMMY (Immuno Mycologics, Inc., OK, EE. UU.).

Los animales fueron sometidos a autopsia completa y se extrajeron hígado, bazo, riñones y pulmones de cada uno. Los órganos fueron macerados y cultivados en ASG-CC e incubados durante 50 días a 25 °C o hasta desarrollo de alguna colonia sospechosa. Las colonias sospechosas fueron reaisladas y estudiadas en base a sus características macroscópicas y microscópicas¹³.

Estudios microbiológicos

La identificación definitiva de los aislamientos fúngicos obtenidos fue realizada por producción de exoantígenos en medio líquido y comprobación de su dimorfismo¹³.

Una vez identificados, los aislamientos fueron caracterizados genéticamente utilizando la técnica RAPD-PCR con los primeros 1281-1283, como se realizó en un trabajo previo³⁰. Las imágenes de los perfiles genéticos obtenidos fueron digitalizadas, normalizadas y comparadas con BioNumerics ver. 5.1 (Applied Maths NV, Bélgica), utilizando el coeficiente de Dice, con los perfiles de 8 cepas de *H. capsulatum* aisladas entre 2000 y 2002 de casos clínicos autóctonos de la Provincia de Buenos Aires, área endémica más cercana al brote (02932, 02934, 02935, 02926, 01842, 01744, 00205, 021196), una cepa de 1999 de un caso autóctono de la Provincia de Chaco (993445), y 3 cepas de pacientes de Neuquén del año 2003 no involucrados en el brote (031830, 031839, 031842). Se incluyeron, además, en el análisis 2 cepas de referencia: G186B (Panamá) y Downs (EE. UU.). Todas las cepas utilizadas en el estudio están depositadas en la colección de cultivos fúngicos del Departamento de Micología del INEI.

Resultados

Los pacientes eran todos de sexo masculino, adultos y sin antecedentes relevantes de enfermedades previas al episodio. Todos eran oriundos de la provincia de Neuquén, residían en la ciudad de Zapala, ubicada a 183 km al oeste de la ciudad capital de Neuquén, y no habían viajado fuera de la provincia con anterioridad. Eran ex trabajadores ferroviarios contratados desde marzo de 2002 para realizar mantenimiento de caminos. Habían realizado tareas de desmalezamiento en un campamento vial en el Puente Picun Leufú y removieron la nieve en las rutas cercanas a Zapala durante los meses de junio y julio de 2002 en grupos de 20 a 30 operarios. Otras tareas, asociadas al brote y estrechamente relacionadas al grupo de personas afectadas fueron: limpieza de un alcantarillado pluvial a principios de agosto sobre la ruta 40 en dirección a Las Lajas (38° 47' S, 70° 13' O), a 20 km de Zapala, y recolección de piedras al pie del Cerro Cansino (38° 52' S, 70° 19' O), frente a la Laguna Miranda. Además, los pacientes habían convivido durante 4 h diarias, de lunes a viernes, en una casilla del campamento de vialidad de Zapala desde marzo y con frecuencia limpiaban excrementos de roedores en ese sitio.

Al ingreso los pacientes estaban lúcidos, estables desde el punto de vista hemodinámico, constatándose en 3 de ellos temperatura axilar de 38 °C, y en uno, febrícula. Todos presentaban un síndrome gripal de 7 a 10 días de evolución, con fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, malestar general, tos seca y disnea de intensidad variable, además de taquipnea. Los niveles de saturación de oxígeno (FiO₂ 21%) eran del 90% en el caso índice y entre el 94-95% en los restantes. Las nuevas radiografías tomadas en el HPN mostraban micronódulos diseminados (fig. 1) en todos los pacientes. Las TAC de tórax confirmaban lo observado en las radiografías. Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de hantavirus Andes, leptospirosis, coccidioidomycosis y VIH fueron negativas, mientras que la intradermoreacción con histoplasmina fue positiva en los 4 pacientes. El resumen de las principales características clínicas, radiológicas y de laboratorio de los pacientes internados y del evaluación de forma ambulatoria se resumen en la tabla 2.

Para realizar un diagnóstico certero, se le efectuó una biopsia pulmonar al caso índice, que posteriormente fue derivado a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) con un cuadro de insuficiencia respiratoria. El análisis preliminar de la biopsia pulmonar mostró levaduras compatibles con *H. capsulatum* en las observaciones microscópicas con diversas tinciones. El diagnóstico microscópico fue confirmado en el Centro de Micología de la UBA. El paciente presentó inestabilidad hemodinámica durante las primeras 72 h, requiriendo asistencia respiratoria mecánica durante 9 días y sostén inotrópico los primeros 6 días. Durante la internación se le realizó otra TAC de tórax de control (fig. 2). El diagnóstico de histoplasmosis fue confirmado por la presencia de anticuerpos anti-*H. capsulatum* en suero y por el desarrollo de *H. capsulatum* en hemocultivo y en la muestra de biopsia pulmonar. La búsqueda de anticuerpos anti-*H. capsulatum* también fue positiva en otros 2 pacientes. Con este resultado se suspendió la antibioterapia y

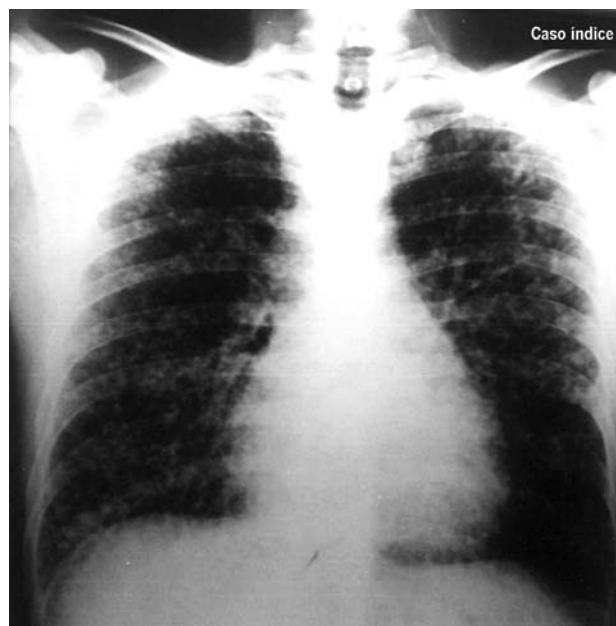


Figura 1. Radiografía de tórax del caso índice. Se observa infiltrado micronodular diseminado con adenopatías en regiones axilares.

se comenzó el tratamiento del caso índice con anfotericina B-desoxicolato hasta 825 mg. Durante su estadía en UCI, el paciente presentó insuficiencia renal aguda, derrame pleural y alteración de las enzimas hepáticas, siendo finalmente dado de alta 20 días después. Hubo de continuar el tratamiento de forma ambulatoria durante 6 meses con itraconazol 400 mg/día durante 3 meses, y luego 200 mg/día hasta completar 6 meses. Durante ese tiempo el paciente presentó un cuadro febril sin que se documentara infección intrahospitalaria intercurrente. Respondió parcialmente a los antiinflamatorios no esteroideos y se controló totalmente con corticosteroides por vía oral.

A los otros 3 pacientes internados se les suspendió el tratamiento con antibiótico y se les evaluó clínicamente hasta que el cuadro se autolimitó de forma espontánea y se les dio el alta hospitalaria entre los 5 y 7 días posteriores al ingreso.

El quinto paciente, citado de forma ambulatoria, acudió a la consulta durante la primera semana de septiembre de 2002. En el interrogatorio refirió haber padecido un cuadro gripal con astenia, decaimiento, cefalea leve, mialgias generalizadas, sensación febril con escalofríos, odinofagia y tos seca, proceso que comenzó el 13 de agosto de 2002 y duró aproximadamente 5 días. La radiografía de tórax mostró imágenes nodulares, pequeñas, que podían corresponder a secuelas o afectación alveolar mínima con calcificaciones aisladas en el parénquima y adenomegalias en la región hiliar. La intradermorreacción con coccidioidina fue negativa. La histoplasmina fue positiva y no presentó anticuerpos anti-*H. capsulatum* en suero.

Tabla 2

Resumen de las características clínicas y del diagnóstico de cada paciente involucrado en el brote de histoplasmosis

| | Caso índice | Paciente 2 | Paciente 3 | Paciente 4 | Paciente 5 |
|---|---|---|--|---|---|
| <i>Edad (años)</i> | 33 | 24 | 26 | 47 | 29 |
| <i>Sexo</i> | M | M | M | M | M |
| <i>Internación (días)</i> | Sí (20) | Sí (5) | Sí (5) | Sí (5) | No |
| <i>Datos clínicos</i> | | | | | |
| Síndrome gripal | + | + | + | + | + |
| Mal estado general | + | + | + | + | + |
| Mialgias | + | + | + | + | + |
| Cefalea | + | + | + | + | + |
| Tos seca | + | + | + | + | NI |
| Fiebre (°C) | + | + | + | + | NI |
| Escalofríos | + | + | + | + | + |
| Taquipnea e hipoxemia | Grave | Leve | Leve | Leve | No |
| <i>Diagnóstico por imágenes</i> | | | | | |
| Rx/TAC tórax | Imagen nodulillar diseminada con patrón reticular, compromiso intersticio-alveolar y adenopatías hiliares | Imagen micronodulillar dispersa con patrón alveolar | Adenopatías hiliares. Imagen micronodulillar con patrón alveolar | Adenopatías hiliares. Imagen micronodulillar dispersa con patrón alveolar | Adenopatías hiliares. Imagen micronodulillar dispersa con patrón alveolar |
| <i>Laboratorio</i> | | | | | |
| Enzimas hepáticas (sVMN) | > 5 | > 3 | NR | NR | NR |
| LDH (sVMN) | > 1,5 | > 2 | > 1,5 | NR | NR |
| T Quick (%) | 64 | 58 | NR | 53 | NR |
| Hemograma | Leucocitosis c/LR | LR | LR | Leucocitosis c/LR | NR |
| Intradermorreacción con histoplasmina (mm) | 15 | 21 | 7 | 23 | 14 |
| Inmunodifusión para <i>Histoplasma capsulatum</i> | + | + | + | - | - |
| EM y cultivo de biopsia de pulmón y hemocultivo | <i>Histoplasma capsulatum</i> | NR | NR | NR | NR |
| <i>Tratamiento</i> | | | | | |
| ARM | Sí | No | No | No | No |
| Oxigenoterapia | No | Sí | Sí | Sí | No |
| FiO ₂ | 90 | | | | |
| Antifúngico | AMB-ITZ | NR | NR | NR | NR |

AMB-ITZ: anfotericina B-itraconazol; ARM: asistencia respiratoria mecánica; EM: examen microscópico; FiO₂: concentración de oxígeno en el aire inspirado; LDH: lactato deshidrogenasa; LR: linfocitos reactivos; NI: no informada; NR: no realizada; Rx: radiografía; TAC: tomografía axial computarizada; TP: tiempo de protrombina; sVMN: sobre el valor máximo normal.

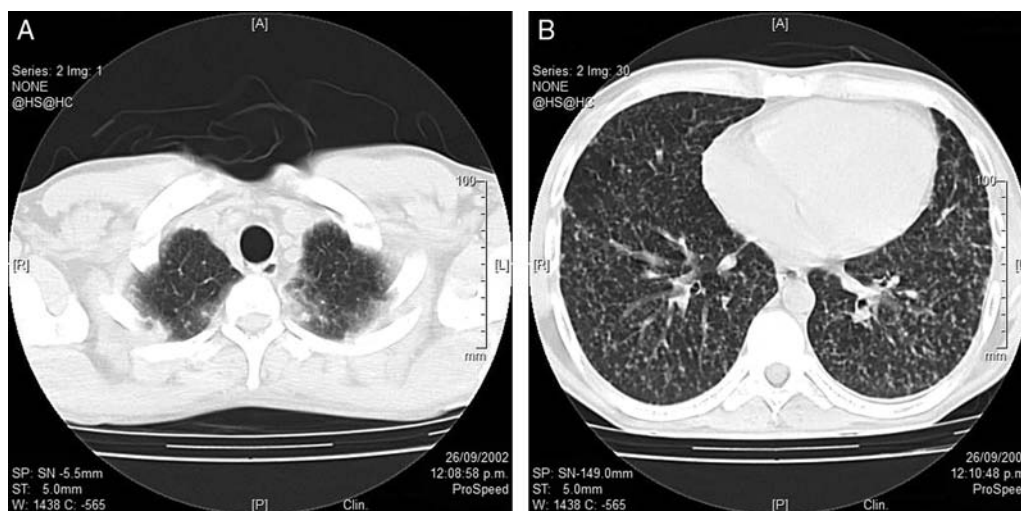


Figura 2. Tomografía axial computarizada de tórax del caso índice. Se observan múltiples imágenes nodulares distribuidas en ambos campos pulmonares desde los vértices (A) hasta las bases (B). Se observa un aspecto alveolar, especialmente en la periferia pulmonar del lóbulo superior derecho e inferior izquierdo. Claro patrón reticular. La condensación parenquimatosa periférica, así como el refuerzo de la pleura en la cara lateral del hemitórax derecho, corresponde a secuela de biopsia. Se observan adenomegalias mediastinales escasas y muy pequeñas en ambos hilos. Adenopatías en regiones axilares. Hacia las bases, se observan nódulos densos, calcificados, de aproximadamente 8 mm de diámetro, compatibles con granulomas secuenciales.

Entre los estudios ambientales, en los cultivos realizados directamente de las muestras de suelo no se obtuvo desarrollo de *H. capsulatum*.

Los órganos extraídos de los 15 ratones centinela y de los 190 ratones inoculados con suelo no presentaron alteraciones macroscópicas y no se pudo aislar *H. capsulatum* en los cultivos. Sin embargo, el suero de los ratones inoculados con la muestra de la alcantarilla oeste, ruta nacional 40, km 22, presentó anticuerpos anti-*H. capsulatum* por CIEF e IDD.

H. capsulatum se desarrolló en agar Sabouraud a 25 °C a partir de los cultivos de la biopsia de pulmón y del hemocultivo del caso índice. El hongo fue identificado por la presencia de macroconidios de 8-12 μm de diámetro con prolongaciones digitiformes y microconidios de 2-4 μm de diámetro, y por termoconversión de fase micelial a fase levaduriforme después de sucesivos pasajes en agar BHI adicionado con cisteína a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5%. Los antígenos extracelulares obtenidos a partir de cultivo estático de los aislamientos presentaron las bandas H y M características de *H. capsulatum*. Las cepas se encuentran depositadas en la Colección de Cultivos del Departamento de Micología del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán con los números 042247 (acrónimo 4617-hemocultivo) y 042248 (acrónimo 4621-biopsia de pulmón).

El análisis de los perfiles genéticos permitió observar que las cepas del paciente involucrado en el brote presentaban baja homología (60%) con el resto de las cepas de pacientes argentinos, y entre un 62 y un 68% de homología con las cepas G186B y Downs, respectivamente (fig. 3).

Discusión

El trabajo aquí presentado describe el cuadro clínico y los hallazgos de laboratorio en 5 pacientes involucrados en un brote por exposición laboral en Neuquén, Patagonia Argentina, una región geográfica excluida del área endémica de histoplasmosis por sus características geográficas. Los individuos enfermos formaban parte de una cuadrilla que se ocupaba de diferentes tareas en el mantenimiento de caminos provinciales, eran residentes de la zona y no habían visitado otras regiones geográficas con anterioridad. Solo el caso índice necesitó tratamiento específico, probablemente debido a causas inherentes al individuo o a una mayor exposición al

microorganismo¹³. Los restantes 4 pacientes tuvieron una sintomatología leve, no necesitaron medicación y solo 3 fueron internados por precaución debido a las características clínicas del caso índice. Dos pacientes no desarrollaron anticuerpos anti-*H. capsulatum* probablemente porque su respuesta humoral fue baja o más lenta; uno de estos tuvo la intradermorreacción frente a la histoplasmina

Dice (Opt:10,00%) (Tol 2,0% - 2,0%) (H > 0,0% S > 0,0%) [0,0% - 100,0%]

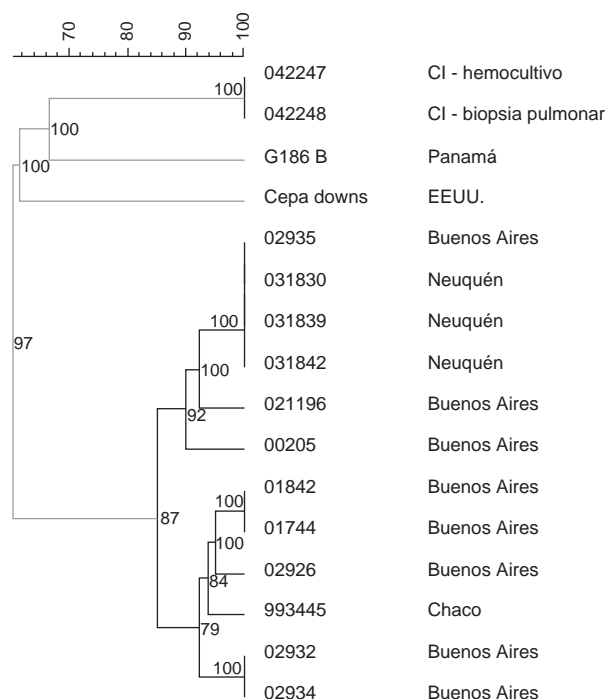


Figura 3. Dendrograma originado a partir de los polimorfismos del ADN de *Histoplasma capsulatum* obtenidos con los primers 1281-1283. Se señala a la derecha de la figura el origen geográfico de los aislamientos. Las cepas 042247 (hemocultivo) y 042248 (biopsia de pulmón) corresponden a las aisladas del caso índice. Se incluyeron 2 cepas de referencia: Downs y la G186B. El análisis fue realizado por BioNumerics ver. 5.1 (Applied Maths NV), utilizando el coeficiente de Dice.

de mayor intensidad (tabla 2); lamentablemente, no se pudieron tomar muestras de suero con mayor tiempo de evolución para poder confirmar el diagnóstico clínico de este paciente.

La detección de anticuerpos anti-*Histoplasma* en los ratones inoculados con la tierra obtenida en la alcantarilla de la ruta 40, km 20, nos permitió inferir el posible lugar donde los individuos adquirieron la infección. Como los primeros estudios de campo se realizaron casi un mes después de la exposición de los pacientes, en ese tiempo la tierra que los operarios habían removido estuvo expuesta a las inclemencias climáticas de la zona y al sol, que tal vez inactivaron o disminuyeron la carga de conidios de *H. capsulatum*. Esta pudo ser la causa por la que el hongo no logró aislarse del suelo de la alcantarilla; no obstante, el sistema inmune de los ratones detectó los antígenos fúngicos produciendo anticuerpos.

La mayoría de los brotes de histoplasmosis se documentan en el Centro y Norte de América^{3,13}. En Sudamérica se han documentado brotes en Colombia¹⁰, en varios estados de Brasil^{7,20-22,25} y, recientemente, uno en Morón (34° 40' S, 58° 38' O), localidad ubicada a 15 km al oeste de la capital de Argentina¹⁸. Lo particular del brote aquí documentado fue que la fuente de infección estaba en el suelo de la meseta basáltica correspondiente a la Patagonia preandina, 1.050 m sobre el nivel del mar entre el paralelo 38° y 39° S, con un clima semiárido y frío propio de la estepa patagónica, con temperaturas medias anuales entre 13 y 14°C⁸; se sabe que *H. capsulatum* puede crecer a estas temperaturas. Sin embargo, la precipitación promedio anual en esta zona es inferior a 200 mm anuales⁸, un valor muy por debajo del necesario para el crecimiento del hongo, que es de 1.000 mm anuales¹³. Los suelos patagónicos son pobres, de texturas francoarenosas, arenosas y arcillosas, con moderada a escasa materia orgánica⁸, muy diferentes a los suelos fértiles con alto contenido en nitrógeno y fosfatos requeridos por *H. capsulatum*¹³. En el área de Zapala se den nevadas entre los meses de mayo y septiembre, además soporta fuertes vientos predominantes del oeste y sudoeste entre los meses de agosto y octubre, con velocidad promedio de 45 km/h, con ráfagas que suelen alcanzar los 180 km/h. Es conocido que los desbordamientos de los ríos y la presencia de piedra caliza en el suelo son factores que pueden influir en la epidemiología y la diseminación de *H. capsulatum* en la naturaleza; en este sentido, a principios de agosto de 2002 tuvo lugar una gran nevada en toda la zona de la cordillera cercana, cubriendo Zapala y Las Lajas. La nieve llegó a los 10 cm y la temperatura descendió a -10°C⁴; este fenómeno meteorológico fue seguido de un deshielo que aumentó el caudal de los ríos y originó aludes. Uno de estos aludes fue el que selló la alcantarilla en la ruta 40, km 22, y la tierra acumulada fue la removida por los operarios. El aluvión provino de la zona serrana al oeste de la ruta, razón por la que en el segundo estudio de campo se buscó el nicho ecológico de *H. capsulatum* en los sistemas cavernarios, ya que estos ambientes son más propicios para que el hongo sobreviva en condiciones adversas^{9,13}. En el interior de las cavernas visitadas no se observaron murciélagos, animales reconocidos como los principales dispersores y reservorios del hongo en la naturaleza; sin embargo, los habitantes del lugar relatan la existencia de quirópteros en la zona en los meses de primavera y verano austral (octubre a marzo). En este segundo estudio de campo tampoco pudimos aislar el hongo.

Una expansión de la histoplasmosis a límites boreales también ocurrió en 2002, cuando un brote de la enfermedad se produjo en Alberta, Canadá, asociado a remociones de tierra en un campo de golf². El brote ocurrido en Alberta y el aquí descrito ampliaron el área endémica de histoplasmosis en América del Norte desde el paralelo 45° N²⁶ al 50° N, y en América del Sur desde el 34° S¹⁸ al 38° S, respectivamente, zonas donde se creía que *H. capsulatum* no podía sobrevivir. En climas inclementes, probablemente este hongo ocupe micronichos en los cuales permanece cuando las condiciones son adversas; esto fue sugerido por otros autores que registraron brotes asociados a microambientes^{13,27}.

Trabajos previos que utilizaron diversos marcadores moleculares pusieron en evidencia una alta homología entre los aislamientos clínicos y ambientales de Argentina⁵. Incluso estudios de secuencias génicas pusieron en evidencia que las cepas argentinas tienen un origen clonal¹¹. Sin embargo, la cepa de *H. capsulatum* involucrada en el brote de Neuquén mostró un perfil genético diferente del resto de las cepas argentinas analizadas. Esto nos hace pensar que la cepa haya sido introducida por algún dispersor natural del hongo, que amplió su hábitat a latitudes australes por razones inherentes al cambio climático global y su efecto sobre la distribución de mamíferos vectores y reservorios de diferentes patógenos⁶; o que se trate de un genotipo restringido y autóctono de la zona geográfica, que no se aísla con frecuencia, hecho que fue observado en aislamientos de *H. capsulatum* del Estado de Goias, Brasil²⁹. En nuestro estudio, otros 4 aislamientos de pacientes de Neuquén tuvieron un perfil coincidente con el genotipo argentino y diferente al del brote. Estos 4 pacientes eran enfermos de sida y no hay certeza de que hayan adquirido la infección en la provincia de Neuquén, por lo que inferimos que pueden ser reactivaciones endógenas de infecciones adquiridas previamente en las áreas endémicas en Argentina. Para determinar si la cepa involucrada en el brote de Neuquén es un genotipo autóctono o introducido sería necesario analizar un número elevado de aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes y de la naturaleza de la zona del brote y de otras regiones geográficas de Argentina, con el fin de caracterizar los genotipos de *H. capsulatum* circulantes en el cono sur de América.

En Argentina, según el Decreto 658/1996, la histoplasmosis se considera una enfermedad ocupacional para «trabajadores de bodegas, cuevas o edificios viejos abandonados»¹⁷; sin embargo, el brote aquí informado se asoció a trabajadores viales que removieron tierra en un lugar donde *H. capsulatum* no tendría un hábitat favorable. Este hecho debe alertar al personal de atención primaria de la salud a incluir la histoplasmosis como diagnóstico diferencial en pacientes con enfermedad respiratoria de etiología no determinada, que hayan manipulado o removido tierra probablemente contaminada con guano, en espacios cerrados o abiertos, incluidas áreas donde la enfermedad no es considerada endémica.

El hecho de que ninguno de los pacientes haya salido de la zona del brote, y la localización indirecta del agente a través de la detección de anticuerpos anti-*Histoplasma* en ratones, sugeriría que la provincia patagónica de Neuquén debería incluirse dentro del área endémica de la histoplasmosis, y que el hongo causal de esta micosis ha encontrado la manera de sobrevivir en ambientes hostiles como la estepa patagónica por debajo del paralelo de latitud 38° S en el continente americano. Probablemente, sería necesario continuar con los estudios ambientales para poder aislar *H. capsulatum* del ambiente en esta zona geográfica.

Conflicto de intereses

Los autores manifestamos que no existen conflictos de intereses de ningún tipo.

Agradecimientos

Agradecemos a los Dres. Roberto D'Angelo y César Dell'Ali del Servicio de Clínica Médica del Hospital Provincial Neuquén «Dr. Castro Rendón», y al personal de Salud del Hospital Interzonal de Zapala por colaborar en diferentes etapas en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes. A la Dra. Graciela Bianchi, de la Clínica de Imágenes «Dr. Mognillansky» de Neuquén por colaborar con el diagnóstico por imágenes. A los Dres. Claudia López, Malco Elder y Pablo Zárate del área de Epidemiología de la Subsecretaría de Salud de la Provincia de Neuquén por apoyar en la ejecución del estudio. Al Dr. Osvaldo Rico del programa VIGI+A, del Ministerio de Salud

de la Nación Argentina, quien gestionó la ayuda económica para financiar parcialmente el estudio de campo realizado en diciembre de 2002 en la Provincia de Neuquén.

Al Dr. Gustavo Ferrer del Programa VIGI+A-PRÉSEC (Programa de Residencia en Epidemiología de Campo) y al Dr. Andrés Kazurquievich por la participación activa y ayuda proporcionada en los trabajos en campo. Al Licenciado en Geología Martín Silvestre por su asesoramiento técnico en el terreno durante la búsqueda de fuentes de infección realizada en los sistemas cavernarios en diciembre de 2002.

También queremos agradecer a las autoridades y personal de la dirección provincial de vialidad del gobierno de la Provincia de Neuquén, a los guardaparques Olalla Martínez y Marcelo Pietrononno y al espeleólogo Ariel Salvo por su colaboración.

Los resultados de este trabajo formaron parte de la tesis para optar al grado de Magíster en Investigación Clínica Farmacológica de la Universidad Abierta Interamericana de Liliana María Calanni.

Bibliografía

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Disposición N.º 6344. Apruébase la reglamentación para bioterios de laboratorios elaboradores de especialidades medicinales y/o de análisis para terceros. Buenos Aires, 20 de Dic de 1996 [consultado 12 Mar 2012]. Disponible en: <http://www.fcv.unl.edu.ar/bioterio/guias/ANMAT6344.pdf>
- Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstuiuk C, Fanning A, et al. Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:163–5.
- Arenas R. Sección IV. Micosis sistémicas. Capítulo 17: Histoplasmosis. En: Arenas R, editor. *Micología médica ilustrada*. 3.ª ed México, D. F.: McGraw Hill Interamericana; 2008. p. 190–9.
- Campetella E. La nevada creó un caos en la ruta 237 y en Piedra del Águila. Río Negro ON LINE [Diario electrónico] 2002;08 [consultado 12 Dic 2011]. Disponible en: <http://www.rionegro.com.ar/arch200208/s06g05.html>
- Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, et al. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. *Rev Argent Microbiol*. 2005;37:46–56.
- Crick HQP. Migratory wildlife in a changing climate. Migratory species and climate change [documento electrónico] 2006. p. 40–45 [consultado 12 May 2012]. Disponible en: <http://www.cms.int/publications/pdf/CMS.ClimateChange.pdf>
- Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AG, Hobaika AB. Surto de histoplasmosis em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34:483–6.
- Easdale MH, Madariaga MC. Zonas agroecológicas homogéneas Patagonia Norte Neuquén y Río Negro. Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales [documento electrónico] 2009. p. 72–93 [consultado 07 Jun 2012]. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/zonas-agroecologicas-homogeneas-patagonia-norte-neuquen-y-rio-negro/>
- Hoff GL, Bigler WJ. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: A review. *J Wildl Dis*. 1981;17:191–6.
- Jiménez RA, Urán ME, de Bedout C, Arango M, Tobón AM, Cano LE, et al. Outbreak of acute histoplasmosis in a family group: Identification of the infection source. *Biomedica*. 2002;22:155–9.
- Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol*. 2003;12:3383–401.
- Kauffman CA. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:115–32.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. En: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editores. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p. 464–513.
- Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusano G, Gorodner J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996;38:349–53.
- Marticorena BE, Borletto N, Negroni R. Estudio de un área endémica de micosis profundas en el norte de la Provincia de Córdoba. *Rev Arg Micología*. 1991;14:20–3.
- Masih D, Marticorena B, Borletto N, Farías C, Negroni R. Epidemiologic study of bronchopulmonary mycosis in the Province of Cordoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1987;29:59–62.
- Ministro de Trabajo y Seguridad Social. Decreto 658/1996 [documento electrónico] 1996;87 [consultado 12 Dic 2009]. Disponible en: <http://www.unc.edu.ar/gestion/higieneseguridadymedioambientelaboral/normativa/contenedor-de-archivos/DECRETO%20658-96%20con%20Preambulo.pdf>
- Negroni R, Duré R, Ortiz Nareto Á, Arechavala AI, Maiolo EI, Santiso GM, et al. Brote de histoplasmosis en la Escuela de Cadetes de la base aérea de Morón, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2010;42:254–60.
- Negroni R, Robles AM, Arechavala A. Histoplasmosis progresiva. Estudio en un lapso de 10 años. *Rev Arg Micología*. 1994;17:14–21.
- Netto CF, Netto JM, Guerra MA, Costa EO. Histoplasmosis epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1976;18:108–12.
- Oliveira FM, Unis G, Severo LC. An outbreak of histoplasmosis in the city of Blumenau, Santa Catarina. *J Bras Pneumol*. 2006;32:375–8.
- Pecanha Martins AC, Costa Neves ML, Lopes AA, Querino Santos NN, Araújo NN, Matos Pereira K. Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. *Braz J Infect Dis*. 2000;4:103–6.
- Rodríguez de Marengo ZJ, Araujo AC, Negroni R, Dubra F, García OE. Encuesta epidemiológica de Histoplasmosis en la provincia de Salta. *Rev Arg Micología*. 1979;2:5–10.
- Rubinstein P, Negroni R. Histoplasmosis. En: Rubinstein P, Negroni R, editores. *Micosis broncopulmonares del adulto y del niño*. Buenos Aires: Ed. Beta; 1981. p. 249–90.
- Severo LC, Oliveira FM, Irion K, Porto NS, Londero AT. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: A 21-year experience. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43:183–7.
- Stobierski MG, Hospedales CJ, Hall WN, Robinson-Dunn B, Hoch D, Sheill DA. Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1220–3.
- Taylor ML, Ruiz-Palacios GM, del Rocío Reyes-Montes M, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, et al. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acaapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;45:435–41.
- Van Gelderen de Komaid A, Duran EL, Madero AM, Carrizo V. Histoplasmosis in northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucuman. *Eur J Epidemiol*. 1992;8:206–10.
- Zancopé-Oliveira RM, Morais e Silva Tavares P, Muniz MM. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;45:443–9.
- Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. Aislamientos de *Histoplasma capsulatum* con morfología aberrante obtenidos en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2006;38:79–83.