

11261  
11  
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
COORDINACION DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PREVALENCIA DE LA HISTOPLASMOSIS EN MEXICO:  
ESTUDIO DEL SINDROME DE HISTOPLASMOSIS OCULAR PRESUNTIVA

TESIS CON  
LIBRO DE TITULO

TESIS PARA OBTENER  
EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)

PRESENTA: M. C. MIGUEL PEDROZA SERES

México, D.F. 1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
HIPOTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	8
Población Estudiada.....	8
Valoración Clínica.....	8
Antígenos.....	8
Reactivos.....	9
Mitógeno.....	9
Caracterización de las Condiciones Inmunológicas de los Sujetos Estudiados.....	9
Pruebas Serológicas.....	9
Intradermorreacción (IDR).....	9
Transformación Linfocítica (TL).....	10
Determinación de HLA en la Población.....	10
Análisis Estadístico.....	10
RESULTADOS.....	12
Estudio de la Población Hospitalizada.....	12
Estudio del SHOP en las Poblaciones de Areas Endémicas.....	13
Estudio del HLA.....	14
DISCUSION.....	16
CONCLUSIONES.....	21
ABSTRACT.....	22
BIBLIOGRAFIA.....	23

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1. Inmunodiagnóstico para micosis en un período de 5 años (1986-1990).....	28
Fig. 2. Número de muestras serológicas procesadas para cada micosis.....	29
Fig. 3. Número de casos de histoplasmosis pulmonar presuntiva, valorados serológicamente.....	30
Fig. 4. Pruebas serológicas positivas en pacientes con inmunodiagnóstico de histoplasmosis pulmonar.....	31
Fig. 5. Porcentajes de intradermorreacción (IDR) positiva a la histoplasmina en las poblaciones estudiadas para el SHOP.....	32
Fig. 6. (A, B). Transformación linfocítica al antígeno histoplasmina en una muestra de una población localizada en una área endémica de histoplasmosis. A) Sujetos que presentaron lesiones retinianas. B) Sujetos sin lesiones retinianas.....	33
Tabla 1. Población de individuos estudiados para SHOP en las áreas endémicas de histoplasmosis.....	34
Tabla 2. Resultado de HLA de los individuos estudiados en Juxtlahuaca, Gro.....	35
Tabla 3. Resultado de HLA de los individuos estudiados en Bucareli, Qro.....	36
Tabla 4. Resultados de HLA de los individuos estudiados en Tlaxcala, Tlax.....	37
Tabla 5. HLA de los individuos con y sin contacto previo con <u>Histoplasma capsulatum</u> de las 3 poblaciones estudiadas.....	38

## RESUMEN

Para corroborar la forma clínica prevalente de la histoplasmosis en México y para identificar la presencia de un síndrome ocular conocido como Síndrome de Histoplasmosis Ocular Presuntiva (SHOP), se estudiaron 2 tipos de poblaciones. En el primero, se consideró a un grupo de 325 pacientes con problemas respiratorios procedentes de diferentes hospitales de concentración de la ciudad de México, durante un período de 5 años. Los resultados indican que de 168 casos probables, solamente 27, esto es el 8.3% de la población total, fueron serológicamente positivos a antígenos de Histoplasma capsulatum y desarrollaron signos y síntomas compatibles con histoplasmosis pulmonar primaria, sin que se encontraran en ellos evidencias clínicas del SHOP. En el segundo tipo de población se consideró el estudio de 253 individuos originarios de 3 áreas geográficas del país. Dos de éstas fueron seleccionadas por su endemicidad para histoplasmosis y se caracterizan por la presencia de minas de mercurio o plata, en los estados de Querétaro y Guerrero y la tercera, en Tlaxcala, fue considerada como testigo, debido a la ausencia de casos reportados. Estos individuos fueron estudiados clínica e inmunológicamente y se les practicó prueba intradérmica con histoplasmina para determinar reactores positivos, los cuales, se sometieron a examen de fondo de ojo para evidenciar la presencia del síndrome. Solamente 5 individuos presentaron lesiones en retina, aunque éstas no fueron compatibles con el SHOP. Los estudios inmunológicos para determinar la respuesta de sus linfocitos a la estimulación con el antígeno específico histoplasmina, realizado por la prueba de transformación linfocítica (TL), mostraron patrones irregulares de estimulación; dos de los 5 individuos con lesiones en retina presentaron respuestas elevadas de TL a la histoplasmina, las cuales también se presentaron en 3 individuos testigos sin lesiones. La caracterización de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad HLA, a una muestra de cada población, no reveló una frecuencia aumentada de un alelo particular, excepto el alelo HLA-B22 (frecuencia génica 0.17 versus 0.009), que estuvo presente en 3 individuos que desarrollaron histoplasmosis pulmonar. No se encontró una frecuencia aumentada del HLA-B7 que ha sido asociado al SHOP en EUA. Los resultados reafirman que la histoplasmosis pulmonar primaria es la forma clínica predominante de la enfermedad en el país y sugieren una importante incidencia de la misma, mientras que los resultados del SHOP apoyan la aseveración de que éste no es prevalente en las poblaciones estudiadas.

## INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La histoplasmosis es la micosis sistémica más importante en el mundo y la de mayor trascendencia en el Continente Americano. En México, puede ser considerada como ocupacional ya que afecta a diferentes trabajadores que se exponen al agente etiológico al penetrar en viejas minas donde crece el parásito en condiciones favorables (1).

La histoplasmosis no es una enfermedad rara en el país, ya que la República Mexicana tiene más de 2,000 minas sin explorar, un gran número de bocaminas indígenas y miles de cavernas de todos tamaños, asegura una morbilidad alta entre los individuos que frecuentan este tipo de recintos como: espeleólogos, excursionistas, recolectores de guano, gambusinos, geólogos, antropólogos y particularmente los trabajadores mineros. Aunque se tienen datos de la existencia de brotes epidémicos en todos los estados de la república, con excepción de Tlaxcala, los estados que presentan mayor frecuencia de brotes son aquellos que debido a la estructura geológica de su suelo poseen mayor número de cavernas y minas, como lo son Guerrero, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Morelos, Yucatán y Chiapas (2, 3).

El agente causal de la histoplasmosis, el hongo dimórfico Histoplasma capsulatum var. capsulatum, Darling 1906, se distribuye ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, principalmente en América. En México, se le encuentra circunscrito casi siempre en cavernas, minas, túneles y casas abandonadas, donde existe guano de murciélago o excretas de aves que contienen micronutrientes utilizados para el desarrollo del hongo y que junto con las condiciones del suelo, humedad y temperatura conforman el nicho ecológico de este microorganismo (4, 5). En este ambiente natural se desarrolla la fase micelial del hongo, y las esporas típicas de esta fase son inhaladas por el individuo que visita los lugares contaminados, adquiriendo la histoplasmosis, que puede manifestarse desde formas clínicas muy leves que se confunden con catarro común hasta formas con síntomas severos. Al parecer, las esporas al llegar al parénquima pulmonar se convierten, dentro de los macrófagos alveolares, en la fase parasitaria del hongo, o sea, las levaduras, que se reproducen en el interior de los fagocitos del hospedero permitiendo el establecimiento de la infección. Este hongo es un parásito intracelular facultativo e induce lesiones granulomatosas en las que la reacción tisular se caracteriza por el predominio de macrófagos en la respuesta inflamatoria, acompañado por un infiltrado de linfocitos. La histoplasmosis pulmonar primaria de México, presenta la mayor tasa de letalidad en el mundo (3), debido posiblemente a que la infección se adquiere en recintos cerrados llenos

de aerosoles de esporas, lo que incrementa la gravedad del cuadro clínico. Este hecho, aunado a una alta frecuencia de brotes epidémicos, convierten a esta micosis en un posible problema de salud pública.

En México se describió por Aguirre-Pequeño, en 1895, un padecimiento con sintomatología semejante a la histoplasmosis pulmonar. Sin embargo, el primer caso comprobado fue dado a conocer por Perrin y Martínez Baez en 1943, y el primer brote epidémico de la enfermedad se presentó en sujetos que entraron a una mina abandonada, llamada "El Refugio" en Lampazos, Nuevo León (6). Los casos de histoplasmosis mejor documentados se señalan a partir de 1948. Desde esta fecha hasta 1955 están descritos 20 brotes y un caso aislado, con un total de 235 sujetos. La mayoría de éstos fueron estudiados por González-Ochoa (2). Estos casos se comprobaron por los antecedentes de contacto previo con guano de murciélago, cuadro clínico, radiografías de tórax y la positividad a la reacción cutánea con histoplasmina. De 1956 a 1963 se reportaron 15 brotes epidémicos y 4 casos aislados, con un total de 187 sujetos (7). En 1984, López-Martínez estudió un brote de 12 estudiantes que penetraron a las grutas de Huachilotla, Guerrero (comunicación personal). Los informes de histoplasmosis en México, a partir de 1963, fueron hechos en su mayoría por Velasco-Castrejón, quien estudió 71 individuos hasta 1979 (8). En 1985, describió 10 brotes epidémicos y 2 casos aislados con un total de 45 sujetos (9). A partir de esta fecha los datos son dispersos y resulta difícil caracterizar los nuevos casos de histoplasmosis. Hasta el presente no existe un estudio dirigido a determinar los factores de riesgo y el estado real de las condiciones que favorecen el desarrollo de la histoplasmosis en las áreas consideradas endémicas para esta enfermedad en México.

La histoplasmosis pulmonar primaria, caracterizada en México a partir de los primeros brotes epidémicos reportados (2), presenta un período de incubación promedio entre 7 a 10 días con una variación de 3 a 30 días. Los casos graves o muy graves desarrollan fiebre continua entre 39 a 41°C, con escalofrío, sudoración profusa, cefalea, dolores musculares y óseos, con debilidad generalizada, y en algunos diarrea. Los signos respiratorios se caracterizan por tos, disnea acentuada, estertores, así como submatidez y matidez a la percusión pulmonar. La cianosis da lugar a la asfixia que es la responsable de la muerte dentro de las 3 a 5 semanas de iniciada la sintomatología. En ocasiones, H. capsulatum puede diseminarse, produciendo hepato y esplenomegalia antes del fallecimiento; estos casos son raros en México, siendo inicialmente descritos por González-Ochoa (2). Algunos sujetos evolucionan hacia la recuperación, desapareciendo la sintomatología después de 1 a 2 meses. Los casos moderados presentan fiebre remitente menor de 38°C, y signos

respiratorios discretos, como tos seca, disnea leve, estertores y pequeñas áreas de submatidez. Este cuadro contrasta con las acentuadas sombras pulmonares que se observan desde los primeros días de la infección y el proceso termina en 3 a 4 semanas. Los casos leves solamente muestran malestar general con cefalea, dolores musculares y óseos, así como, febrícula con sudoración. No manifiestan signos ni síntomas respiratorios, sin embargo, la radiografía de tórax muestra lesiones micronodulares. Después de 1 a 2 semanas este cuadro desaparece y el sujeto entra a una etapa de recuperación (2, 10).

La forma clínica de histoplasmosis pulmonar crónica, se presenta principalmente en adultos, pudiéndose encontrar cavitaciones, con un cuadro crónico indistinguible de la tuberculosis pulmonar (10).

La histoplasmosis diseminada se reporta principalmente en EUA, así como, una entidad clínica oftalmológica denominada Síndrome de Histoplasmosis Ocular Presuntiva (SHOP) (11-19). A reserva de los casos aislados de histoplasmosis diseminada estudiados por González-Ochoa no encontramos ningún otro caso descrito en el país, excepto algunas comunicaciones personales de clínicos especialistas como por ejemplo, la de Velasco-Castrejón y López-Martínez quienes refieren respectivamente a dos pacientes que desarrollaron la forma aguda fatal diseminada.

Es oportuno señalar que un gran número de sujetos adquiere la infección en forma subclínica por lo que se incluyen en el tipo asintomático de la enfermedad, además, no todos los pacientes con la forma pulmonar presentan cambios radiográficos y algunos pacientes pueden desarrollar una reinfección endógena.

Es posible que la baja frecuencia, de la forma clínica de histoplasmosis diseminada en México, se deba a que no se logre diagnosticar adecuadamente, por falta de información médica especializada, por desconocerse las áreas endémicas del país donde pudieran existir muchos casos no diagnosticados, o porque, carecemos de un factor genético predisponente para esta forma clínica de la enfermedad.

Se han relacionado algunas formas de la enfermedad con marcadores genéticos, por ejemplo, en EUA, el SHOP se desarrolla con mayor frecuencia en individuos que tienen ciertos tipos de HLA. En México como en otros países, el SHOP no ha sido notificado. Este cuadro clínico se caracteriza por cicatrices coriorretinianas en la retina periférica en forma de "sacabocado", coroiditis peripapilar, lesión macular disciforme con desprendimiento de retina subyacente y sin signos de uveitis posterior o anterior (14, 15). La vinculación de *H. capsulatum* como agente causal del SHOP se basa en datos epidemiológicos e inmunológicos, ya

que no se ha logrado demostrar la presencia del hongo en los ojos de los pacientes. Ochenta y ocho por ciento de los pacientes con el síndrome, presentan una intradermorreacción positiva a la histoplasmina y más del 90% dan una alta respuesta a la transformación linfocítica inducida por el antígeno específico (16). Se han encontrado calcificaciones pulmonares en radiografía de tórax de algunos sujetos con diagnóstico clínico presuntivo del síndrome. Estudios para correlacionar la presencia de un factor inherente del sujeto con el SHOP, han demostrado que el antígeno B7 del complejo principal de histocompatibilidad (HLA), el HLA-B7, se presenta con una frecuencia entre el 54.8 y el 78% de los sujetos estudiados en los EUA, a diferencia de los testigos sanos (17, 18).

No siempre los pacientes tienen todos los signos del síndrome. El antígeno HLA-B7 se encuentra con alta frecuencia en pacientes con SHOP que tienen cicatriz disciforme de la mácula, a diferencia de los que solamente tienen cicatrices periféricas. Un estudio sobre el antígeno HLA-DRw2, demuestra que éste se asocia con el SHOP en un 62% no solamente en el caso de cicatrices maculares disciformes, sino también, cuando hay cicatrices coriorretinianas periféricas (19).

La relación de HLA con el riesgo de adquirir o presentar una determinada forma clínica de la enfermedad, se ha reportado en otras micosis. Un aumento de la frecuencia de HLA-B15 y una disminución de HLA-B5 se ha asociado en pacientes con cromoblastomicosis, en Brasil (20); por otro lado, Tsuneto y cols. (21) describieron que el riesgo relativo de contraer cromoblastomicosis, en una población de 32 pacientes, está asociado al HLA-A29. En la paracoccidioidomicosis, diferentes autores señalan diversas correlaciones de HLA y el riesgo de adquirir la enfermedad. Restrepo y cols. (22), en Colombia, encontraron un predominio de HLA-A9 y HLA-B13 en sujetos enfermos; en Brasil, Lacerda y cols. (23) encontraron una frecuencia mayor de asociación con HLA-B40. En la coccidioidomicosis, existe una mayor frecuencia del HLA-A9 en los sujetos que cursan infección diseminada que en los que desarrollan infección pulmonar (24). Se han estudiado otros factores genéticos predisponentes y en el caso de la coccidioidomicosis, individuos con grupo sanguíneo B tienen una probabilidad 2 veces mayor de tener infección diseminada que infección pulmonar localizada (25). En vista de que se carece de registros y estudios integrales de histoplasmosis en México y con la finalidad de aportar mas información sobre el panorama real de la histoplasmosis en el país, el presente trabajo refiere la frecuencia y caracterización de la(s) forma(s) clínica(s) de histoplasmosis en una población de pacientes con probable etiología fúngica, que acuden a hospitales de concentración para enfermedades pulmonares en la ciudad de México.

Asimismo, pretende conocer la distribución, importancia epidemiológica y socioeconómica de esta enfermedad en zonas mineras del país, además, de confirmar la existencia de lesiones tardías de histoplasmosis como el SHOP en una población susceptible circunscrita a áreas endémicas, puesto que este cuadro clínico podría ser responsable de la incapacidad laboral de muchos trabajadores por pérdida de la función.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la presencia de un gran número de minas, cavernas y grutas que poseen los estados de la República Mexicana, y la información dispersa sobre la histoplasmosis en el país, se planteó este estudio basado en la toma de muestra y de información de hospitales de la capital, donde se concentran muchos de los casos de padecimientos respiratorios procedentes de diversas zonas geográficas del país. Además, se buscó obtener mayores datos sobre esta micosis, la frecuencia de sus formas clínicas, en especial la identificación del SHOP en algunos estados de producción minera, probablemente endémicos para histoplasmosis.

## HIPOTESIS

1. Los pacientes hospitalizados por enfermedades respiratorias de etiología fúngica presuntiva, procedentes de distintas regiones de la república, permitirán establecer un mejor panorama sobre el estado de la histoplasmosis en México, ya que estos hospitales concentran enfermos con padecimientos pulmonares de diferentes áreas del país.

2. La histoplasmosis presenta una alta incidencia en los estados mineros de la República Mexicana, debido a que éstos reúnen las condiciones naturales y sociales para el desarrollo de la enfermedad.

3. Los sujetos de las áreas endémicas de histoplasmosis que tuvieron contacto previo con el hongo, podrían presentar SHOP, si H. capsulatum es el agente etiológico del síndrome.

## OBJETIVOS

1. Conocer la forma clínica de histoplasmosis que prevalece en el país, con base en un estudio de pacientes con padecimientos pulmonares, que acuden a instituciones de salud en la capital, durante un periodo de 5 años.

2. Determinar clínicamente la existencia del SHOP en sujetos radicados en áreas endémicas para histoplasmosis.

3. Determinar en una pequeña muestra de cada población estudiada para el SHOP, la presencia de algún alelo de HLA que pudiera estar relacionado con la histoplasmosis.

## MATERIALES Y METODOS

**Población Estudiada:** Se estudiaron 2 tipos de poblaciones. 1) Un grupo de 325 pacientes provenientes de diferentes hospitales de la ciudad de México, entre ellos, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), de la Secretaría de Salud (S.S.); el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" S.S; el Instituto Nacional de Pediatría S.S; y el Hospital Regional "20 de Noviembre" del Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado (ISSSTE). A todos se tomaron muestras para pruebas serológicas para diferentes micosis sistémicas en un período de 5 años, comprendido de 1986 a 1990. De este grupo sólo 7 pacientes fueron seleccionados para caracterización clínico-oftalmológica del síndrome de histoplasmosis ocular presuntiva (SHOP). 2) Un segundo grupo de 253 sujetos procedentes de 3 distintas zonas geográficas del país, 2 de ellas elegidas por ser mineras, conteniendo gran cantidad de grutas o cavernas. Estas zonas se encuentran en los estados de Querétaro (Qro.), Guerrero (Gro.) y las poblaciones estudiadas fueron: Bucareli, Qro. y Juxtlahuaca, Gro. Se consideró como testigo una población del estado de Tlaxcala por ser el único lugar del país donde no existe registro oficial de casos de histoplasmosis. Se practicaron en estos individuos exámenes clínico-oftalmológicos dirigidos al estudio del SHOP. Todos los individuos incluidos en este grupo fueron caracterizados según la respuesta a la intradermorreacción a la histoplasmina. Los estudios realizados se llevaron a cabo bajo el consentimiento de todos los individuos involucrados.

**Valoración Clínica:** Los pacientes diagnosticados presuntivamente como histoplasmosis u otra micosis pulmonar se sometieron a valoración clínica completa, incluyendo historia familiar, exámenes de laboratorio de rutina, radiografías de tórax, examen microbiológico de esputo, y en algunos, cuando así se requirió, se practicó biopsia pulmonar a cielo abierto, por sus médicos tratantes.

Los sujetos estudiados para el SHOP se sometieron a valoración oftalmológica completa realizada independientemente por 2 especialistas, incluyendo historia clínica y examen de fondo de ojo con midriasis medicamentosa y oftalmoscopia indirecta.

**Antígenos:** Se utilizaron antígenos crudos obtenidos a partir de hongos aislados de casos humanos autóctonos, los cuales, fueron donados muy gentilmente por la Dra. C. Toriello, jefe del laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Los antígenos empleados, la histoplasmina, la coccidioidina, la aspergилina y la candidina fueron previamente estandarizados en el laboratorio (26-28).

Reactivos: Todos los reactivos utilizados en las diferentes metodologías procedieron del laboratorio Merck, con excepción de los que se señalan en el texto.

Mitógeno: Se utilizó fitohemaglutinina (FHA) (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) y se ajustó a una concentración de trabajo a 500  $\mu\text{g}$  de proteína/ml de RPMI-1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, N. Y.).

#### Caracterización de las Condiciones Inmunológicas de los Sujetos Estudiados.

Pruebas Serológicas: Se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes, con los cuidados generales requeridos para el manejo de muestras biológicas. Se realizaron las siguientes pruebas: reacción de fijación de complemento (RFC), precipitación en tubo capilar (PT), doble inmunodifusión en gel (DID) y ensayo inmunoenzimático (ELISA). La RFC se realizó por la microtécnica de 50% de hemólisis (29) y se elaboró con base en un método ya estandarizado (27). Los títulos se expresaron como la recíproca de la más alta dilución de suero que produjo una reacción positiva. Las pruebas de precipitaciones se realizaron también con base en un método estandarizado (28, 30), siendo que la DID se realizó por el método de Ouchterlony (30) con el sistema de 1.5% agarosa-amortiguador salino de fosfato pH 7.4 o el sistema agarosa-glicina usualmente empleado en el laboratorio, complementando ambos sistemas con 0.01% de azida de sodio (28, 31).

Para la prueba de ELISA, se utilizó anti-gammaglobulina polivalente humana conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma). La prueba fue estandarizada en el laboratorio por previa titulación del antígeno histoplasmina, empleando una concentración óptima de 100  $\mu\text{g}$  de proteína por pozo de la placa. Se siguió el método indirecto según Voller y cols. (32). La prueba se reveló con p-nitrofenilfosfato (Sigma) en amortiguador de dietanolamina pH 9.8. Después de detener la reacción con NaOH 3M se leyó en un microlector de ELISA (Dynatech, modelo MR-300, Alejandría, Va.) a 405 nm, corrigiendo los valores con la absorbancia no específica de sueros de sujetos sanos que sistemáticamente dieron reacción negativa en diferentes pruebas inmunes con el antígeno histoplasmina.

Intradermorreacción (IDR): Se utilizó histoplasmina a una concentración aproximada de 10  $\mu\text{g}$  de proteína/0.1 ml de solución salina isotónica estéril, previa estandarización in vivo. La prueba se realizó aplicando 0.1 ml del antígeno intradérmicamente en la cara interna del antebrazo izquierdo. La lectura se realizó a las 24 y 48 h, considerándose positiva la reacción eritematosa con induración mayor o igual a 5 mm de diámetro.

Transformación Linfocítica (TL): A los individuos seleccionados para esta prueba, se les tomó una muestra de 10 ml de sangre en un tubo conteniendo 0.6 ml de heparina (1000 U/ml, Abbott Laboratories, North Chicago, Ill.). Se separaron las células mononucleares por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077) (Sigma). Estas se colectaron, lavaron y suspendieron en medio RPMI-1640 a pH 7.2 con 20 mM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N' 2-ácido etanosulfónico) (Sigma) suplementado con 2 mM L-glutamina, piruvato, 10% de suero fetal bovino y 50 µg/ml de gentamicina (Scheramex, México). La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión con azul de tripano y fue siempre mayor del 90%. Finalmente, se resuspendieron las células en RPMI-1640, las cuales se utilizaron para TL (33). A las 24 h de cultivo, el antígeno histoplasmina fue adicionado previa determinación de la dosis óptima estimulante en el laboratorio. Se utilizó fitohemaglutinina como testigo de estimulación mitogénica, a las 48 h de cultivo. Después de incubar las células 120 h con el antígeno y 72 h con el mitógeno, 18 h antes de cosecharlas, se adicionó a cada cultivo celular, 1 µCi de timidina-[<sup>3</sup>H] (actividad específica 6.7 Ci/mmol, Dupont-NEN Research Products, Boston Mass.). Se recolectaron las células y las muestras conteniendo cada cultivo celular fueron colocadas en viales con líquido de centelleo. Se midió la radioactividad en un contador de centelleo (Beta Scintillation Spectrometer 3255, Packard Instrument Co., Inc., Rockville, Md.). Células no estimuladas con el antígeno y células tratadas con fitohemaglutinina fueron procesadas como testigos. Los resultados se reportaron como 10<sup>3</sup> cuentas por minuto. Todos los cultivos fueron realizados por triplicado.

Determinación de HLA en la Población: Se extrajeron 25 ml de sangre periférica de los individuos seleccionados para el estudio; se utilizaron 23 ml para la tipificación de los genes de clase I (HLA-A, B y C), los cuales se estudiaron mediante la prueba de microlinfocitotoxicidad (34). A partir de células separadas de sangre periférica por Fycoll-Hypaque y ajustadas a 5 x 10<sup>5</sup>/ml, se sembraron 1 µl por pozo en placas de 72 pozos que contenían antisueros para cada una de las especificidades del loci HLA-A, B y C (C-Six Diagnostics, Mequon, Wisconsin, EUA). Después de añadir complemento para lisar las células positivas para cada HLA, se colorearon con eosina (colorante vital) y se procedió al conteo de las células íntegras en microscopio invertido de contraste de fase.

Análisis Estadístico: Se utilizó la prueba de Chi cuadrada para calcular las diferencias significativas entre las poblaciones sometidas a las intradermoreacciones, considerando el valor de  $p \leq 0.05$  como significativo (35). Se utilizó la prueba de Fisher para calcular la asociación de HLA-B22 con el riesgo de desarrollo de enfermedad

pulmonar en sujetos con contacto previo con el hongo, considerando la  $p \leq 0.05$  como significativa (35). Las frecuencias génicas de los patrones de HLA considerados importantes fueron calculadas según se ha descrito anteriormente por Arellano y cols. (36).

## RESULTADOS

### Estudio de la Población Hospitalizada.

Se analizaron las respuestas de pruebas serológicas de 325 muestras procedentes de pacientes de diferentes hospitales de concentración de la ciudad de México, durante el período comprendido entre julio de 1986 a septiembre de 1990. Los pacientes fueron diagnosticados clínicamente con probable micosis sistémica. El número de sujetos estudiados por año fue de 65, 72, 74, 81 y 33, respectivamente. El promedio de muestras procesadas en estos 5 años alcanzó un valor de 65 o más por año, con excepción del último año cuyo número de muestras fue inferior al valor promedio. El mayor número de muestras procesadas correspondió al año de 1989 y el menor a 1990 (Fig. 1).

Se procedió al inmunodiagnóstico de individuos clínicamente catalogados con un cuadro pulmonar para diferentes micosis, entre ellas, la histoplasmosis con 81 muestras, la coccidioidomicosis con 31, la aspergilosis con 103, la candidosis sistémica con 6 y 104 muestras de micosis en las cuales no se especificó el diagnóstico clínico presuntivo (Fig. 2).

Del total de 325 sujetos estudiados, se detectaron 168 casos de histoplasmosis pulmonar presuntiva (51.69%) comprendidos en los 81 sujetos diagnosticados clínicamente como histoplasmosis y en 104 casos catalogados como "micosis donde no se especificó el diagnóstico clínico" en la figura 2. De estos 168 sujetos con histoplasmosis presuntiva, solamente 27, esto es el 8.3%, presentaron dos o más pruebas serológicas positivas a antígenos de *H. capsulatum*, siendo los 141 restantes (43.38%) reactivos a una sola prueba inmune (Fig. 3). La mayoría de estas muestras fueron positivas a las pruebas de precipitación, siendo 27 precipitaciones en tubo capilar y 14 inmunodifusiones en gel; además, 17 resultaron con títulos superiores a 1:8 en las reacciones de fijación de complemento (Fig. 4).

Se practicó la prueba de ELISA en casos de resultado serológico dudoso y sólo en 6 se consideró la prueba positiva, con títulos superiores a 1:640, utilizando el antígeno crudo histoplasmina (datos no graficados).

Con base en sus expedientes clínicos, se realizó en los 27 sujetos que presentaron 2 pruebas positivas a antígenos de Histoplasma, un estudio retrospectivo. Existe una predominancia del sexo masculino sobre el femenino, en una relación 4:1. Sus edades variaron en un rango de 16 a 66 años y se dedicaban a distintas actividades laborales. Cinco de ellos procedían del Distrito Federal, 2 del estado de Morelos, Guerrero e Hidalgo, 1 de Jalisco y Veracruz, y por

último, para los restantes no se encontró registro del lugar de origen. Nueve refirieron probable contacto directo con el hongo, asentado por entrada a grutas, minas, casas deshabitadas, cisternas, recintos varios, donde existe abundante material orgánico. Los demás sujetos, no tenían antecedentes de contacto previo, sin embargo, algunos eran originarios de las áreas consideradas endémicas para histoplasmosis. De estos últimos pacientes, 4 tenían inmunosupresión; uno de 66 años padecía de artritis reumatoide en tratamiento con esteroides durante un período de 4 años a la fecha de estudio; el otro de 55 años tenía diagnóstico de carcinoma pleural indiferenciado de células gigantes corroborado por biopsia; otro de 43 años con HIV positivo; y finalmente un paciente de 27 años, adicto a la marihuana, con antecedente de homosexualidad pero sin HIV confirmado.

En ningún paciente se demostró la presencia del H. capsulatum en cultivo a partir de muestras de esputo, sin embargo, en biopsias a cielo abierto practicadas en 9 sujetos, se encontraron en 4 de ellos, la presencia de levaduras compatibles morfológicamente con H. capsulatum. En todos los pacientes se realizó búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistentes, por baciloscopía y por cultivo de esputo, no habiendo evidencia de micobacterias.

De la población de pacientes hospitalizados, sólo 7 refirieron molestias oculares, por lo que se les practicaron exámenes clínico-oftalmológicos correspondientes, no encontrándose lesiones compatibles con el SHOP. Dado que los casos hospitalizados no refirieron aparente compromiso ocular, y frente a la necesidad de valorar la existencia de una forma clínica de histoplasmosis desconocida en el país, se consideró en el presente trabajo extender el estudio a poblaciones susceptibles que han estado en contacto más cercano y persistente con el hongo, como son habitantes de áreas endémicas.

#### Estudio del SHOP en las Poblaciones de Áreas Endémicas.

Se seleccionaron 2 zonas geográficas del país, con posibles focos endémicos para histoplasmosis, que se caracterizan por contener minas de mercurio o plata. Se incluyó además una población testigo procedente del único estado de la república en que no se ha reportado oficialmente casos de histoplasmosis. Se estudiaron un total de 253 sujetos, los cuales fueron valorados clínica e inmunológicamente. Estos sujetos procedieron de las 3 poblaciones estudiadas y comprenden individuos de ambos sexos (Tabla 1). A todos se les aplicó IDR con histoplasmina para determinar la frecuencia de reactores positivos. Los resultados de la IDR en las 2 primeras áreas muestran porcentajes elevados de reactores histoplasmino positivos, siendo de 83% en Juxtlahuaca, Gro., y de 56% en Bucareli, Qro., mientras que

el resultado en Tlaxcala, Tlax. no demostró evidencia de contacto inmunosensibilizante con el hongo, considerando, que la frecuencia de IDR positivas fue del orden de 2.04%. La diferencia entre las 2 poblaciones con porcentaje alto de IDR positiva a histoplasmina y la población testigo de Tlaxcala fue muy significativa con una  $p \leq 0.0001$  (Fig. 5). Se practicaron pruebas serológicas en muestras de las distintas poblaciones siendo los resultados sistemáticamente negativos para las precipitaciones, a excepción de un sujeto en Bucareli, Qro. Los resultados de las RFC desarrollaron títulos entre 1:16 y 1:32, siendo que los resultados de ELISA alcanzaron títulos de 1:640, en un 94 % de la población de Bucareli (datos no graficados). La valoración oftalmológica de individuos que aceptaron voluntariamente someterse al examen, con el objeto de rastrear evidencia clínica del SHOP, se realizó en 82 sujetos de Juxtlahuaca, Gro., 73 de Bucareli, Qro. y 98 de Tlaxcala, Tlax. De estos individuos, ninguno presentó los signos descritos para el síndrome. En Bucareli, Qro., en 5 individuos se observaron lesiones en fondo de ojo, sin embargo, no indicativas del SHOP, siendo éstas puntiformes, parafoveales, de tamaño aproximado a  $300 \mu$ , de color amarillento y sin levantamiento de retina subyacente. En todos estos casos la agudeza visual fue de 20/20, descartando la posibilidad de drusas. A estos 5 sujetos se les tomó muestra de sangre para la realización de la TL. Dos de ellos desarrollaron niveles de incorporación de timidina- $^3\text{H}$  elevados de  $17.5$  y  $18 \times 10^3$  cpm, cuando sus células fueron estimuladas con el antígeno histoplasmina a diferentes rangos de concentración (Fig. 6 A), siendo que las lecturas de las pruebas de IDR fueron positivas en los 5 sujetos mencionados. Como testigos se procesaron células de 13 sujetos sin evidencias de lesiones en fondo de ojo. De estos últimos, 2/13 desarrollaron cuentas radioactivas superiores a  $16 \times 10^3$  en la prueba de TL estimulada con el antígeno histoplasmina y 3/13 dieron resultados entre  $7-11 \times 10^3$  cpm (Fig. 6 B), los restantes, no graficados, esto es 8/13, dieron incorporaciones de timidina- $^3\text{H}$  inferiores a  $0.5 \times 10^3$  cpm; los resultados de las pruebas de IDR para el grupo testigo fueron positivos en 10 sujetos. Los testigos de estimulación celular por FHA están ilustrados en cada grupo de individuos (Fig. 6 A y B) resaltando las lecturas máximas y mínimas de cada grupo.

### Estudio del HLA.

La determinación de HLA se realizó a sujetos de las tres áreas geográficas estudiadas. Se tomaron muestras de sangre a 8, 5 y 10 individuos, de Juxtlahuaca, Gro., Bucareli, Qro., y de Tlaxcala, Tlax., respectivamente. De los 8 sujetos de Juxtlahuaca, Gro., (Tabla 2), los señalados con el número 2 y 3 refirieron su primer contacto con el hongo hace más de 15 años, el paciente 2 entra a la gruta 1 o 2 veces por año con el fin de acarrear guano de murciélago para abono de la tierra, y la paciente 3 ha entrado a las

grutas aproximadamente 10 veces desde su primer contacto. El paciente 4 refiere su primer contacto desde hace 31 años y como guía de turistas entra frecuentemente a las grutas. Los pacientes 1 y 8 tuvieron su primer contacto hace 9 y 10 años, respectivamente, siendo el primero guía de turistas y el segundo campesino, el cual también acarrea guano de murciélago para abono de la tierra. El paciente 7, su primer contacto fue hace 3 años, y solamente ha entrado en 2 ocasiones más a la gruta. Los pacientes 5 y 6 no han referido contacto (Tabla 2). En la población de Juxtlahuaca, Gro. estudiada para HLA hay que destacar que el marcador más frecuente encontrado fue el HLA-A2 seguido por el A9 y solamente 3 individuos presentaron el B7 (Tabla 2). De Bucareli, Qro. (Tabla 3) los sujetos 1, 3 y 4 refirieron su primer contacto hace 25 años, y laboraron como mineros durante 7 años el primero y 2 años los sujetos 3 y 4, y esporádicamente acarreaban guano de murciélago. Estos presentaron sintomatología compatible con un cuadro clínico moderado a severo de histoplasmosis pulmonar primaria, y es importante señalar que estos 3 individuos comparten el marcador B22. El sujeto 2 tuvo su primer contacto hace aproximadamente 10 años y ocasionalmente acarreo guano de murciélago para abono. La paciente 5 no ha referido contacto. Los resultados de HLA muestran que el HLA-A2 y A9 se encuentran en la mayoría de los individuos estudiados y no hay evidencias de B7 en ninguno (Tabla 3). Los individuos de Tlaxcala, Tlax., presentaron marcadores más homogéneos, sin embargo, resalta la ausencia de B7 (Tabla 4). Ningún individuo de este estado refirió haber entrado a grutas o minas, por lo que se eligieron como testigos, además en este estado no se ha reportado oficialmente ningún caso de histoplasmosis pulmonar (Tabla 4). De las 3 poblaciones estudiadas, los alelos más frecuentemente encontrados fueron del locus A el A2 (frecuencia génica 0.35 versus 0.27 de controles normales mexicanos), el alelo A9 (0.20 versus 0.16), el A19 (0.17 versus 0.19) y el A28 (0.12 versus 0.12). Del locus B no encontramos aumento de algún alelo en particular, sin embargo, el B22 solamente se detectó en sujetos que pertenecían a Bucareli, Qro., y que desarrollaron la enfermedad pulmonar ( $p \leq 0.05$ ). El alelo B7 no está aumentado en ninguna de las 3 poblaciones (frecuencia génica 0.07 versus 0.05).

La comparación de los marcadores de HLA, en sujetos que tuvieron contacto previo con el hongo, con aquéllos que no lo tuvieron, se observan en la tabla 5, donde destaca la mayor frecuencia del HLA-A2 y A9 y la baja presencia del HLA-B7 en los individuos que refirieron contacto con el hongo.

## DISCUSION

Debido a la escasez de datos recientes sobre las diferentes formas clínicas de la histoplasmosis en México, el presente trabajo aporta información adicional importante sobre esta enfermedad en el país.

La población estudiada comprendió a pacientes procedentes de diferentes estados de la república y admitidos en hospitales de concentración de enfermedades respiratorias, pertenecientes a la Secretaría de Salud y otras instituciones del sector salud, localizados en la capital de la república, durante 5 años. El estudio se extendió además a poblaciones de zonas rurales posiblemente endémicas para histoplasmosis.

Las muestras procesadas fueron seleccionadas a partir de pacientes con diagnóstico clínico de micosis y se les practicaron pruebas serológicas para histoplasmosis, coccidioidomicosis, aspergilosis y candidosis fundamentalmente (Fig. 2), considerando que estas micosis son las que más frecuentemente se asocian a padecimientos respiratorios de etiología fúngica en México.

En general, las solicitudes de diagnóstico para enfermedades respiratorias de etiología micótica son inferiores a las presentadas para padecimientos de etiología bacteriana; esto refleja una menor prevalencia de padecimientos micóticos frente a los bacterianos, sin embargo, hay que considerar que existe un desconocimiento de las enfermedades producidas por hongos, y en ocasiones se puede presentar un diagnóstico erróneo confundiendo una micosis pulmonar con otras entidades nosológicas respiratorias similares. Por otro lado, para adquirir ciertas micosis profundas o sistémicas, se debe tomar en cuenta el ecosistema de los hongos, que tiene localizaciones especiales, como en el caso del H. capsulatum que se ubica en espacios cerrados, el de Paracoccidioides brasiliensis y el de Coccidioides immitis que se ubican en campo abierto con plantaciones o en zonas áridas, respectivamente. Además, contribuye al desconocimiento de las micosis, el hecho de que la población rural, que está mas expuesta a las esporas del hongo, tienen graves problemas económicos y carencias en centros de salud, lo que explica en parte el porque muchos casos de enfermedades micóticas son ignorados, entre ellas la histoplasmosis. Estas aseveraciones justifican la idea prevalente de que las micosis pulmonares son poco frecuentes, sin embargo, estudios más orientados, podrían cambiar este panorama, como en parte lo ha hecho en los últimos años el SIDA, ya que éste puede presentar una alta asociación con micosis oportunistas, como la candidosis y la criptococosis, entre otras (37-39).

En el estudio de los pacientes hospitalizados durante el período de 5 años, los casos clínicamente sospechosos de histoplasmosis pulmonar representaron un porcentaje alto de 51.69% del total de sujetos valorados, tomando en cuenta que dentro de las muestras procesadas se encontraban algunas clasificadas como micosis en general y otras de sujetos catalogados como pacientes clínicamente diagnosticados con histoplasmosis. En la figura 2 se observa que solamente la aspergilosis pulmonar rebasa los casos sospechosos de histoplasmosis. Aunque en este estudio se detectaron 168 sujetos con una prueba inmunológica positiva al antígeno de H. capsulatum, ellos no deben considerarse como casos de histoplasmosis definitiva, por la falta de repetición de sus resultados serológicos y por la posibilidad de reacciones cruzadas con otras enfermedades respiratorias causadas por hongos y organismos afines, como coccidioidomicosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, candidosis e incluso padecimientos de etiología bacteriana como tuberculosis y nocardiosis. El análisis de estos resultados sugiere que solamente aquéllos con dos o más pruebas serológicas positivas y con títulos persistentes deben considerarse como probable histoplasmosis activa, razón por la cual, sólo apoyamos el diagnóstico de certeza en 27 sujetos. Se consideraron en esta apreciación, resultados positivos de todas las precipitaciones y los títulos mayores de 1:8 o 1:16 para RFC y de 1:160 o 1:320 para ELISA con el antígeno crudo histoplasmina (Fig. 4), según nuestro criterio. Cuando son utilizados antígenos purificados, como se ha demostrado previamente en RFC (27) y en ELISA (40), títulos inferiores a los antes mencionados podrían considerarse positivos.

Los títulos de serología de 1:8 o 1:16 en áreas endémicas, no apoyan un diagnóstico positivo para la enfermedad, sino un contacto previo con el agente etiológico. En estos casos, se tienen que escoger títulos superiores a 1:32 en RFC y 1:640 en ELISA, para considerar su interpretación diagnóstica. En ELISA, aunque se estimen títulos elevados, considerando la alta sensibilidad del método, su aplicación diagnóstica en áreas endémicas donde prevalecen un contacto persistente con el hongo, es dudosa como indicativo de infección activa.

Los resultados de las pruebas de precipitación con antígeno de H. capsulatum en los 27 sujetos hospitalizados sugieren posible infección reciente, ya que los anticuerpos precipitantes en la histoplasmosis son indicadores de infección temprana. Los datos clínicos de los 27 pacientes refieren cuadro clínico correspondiente a la forma pulmonar primaria sin que hubiera la menor sospecha de una forma clínica distinta.

La existencia de diferencias en las respuestas serológicas de precipitación se explican metodológicamente, la precipitación en tubo es una prueba más precisa y semicuantitativa, mientras que la DID es cualitativa y en la histoplasmosis es muy útil para revelar la presencia de 2 antígenos específicos denominados h y m, pero que sin embargo, no son muy constantes en las cepas de H. capsulatum; además la respuesta de DID varía con los sistemas de sustrato sólido y amortiguadores utilizados, siendo el más recomendable el de agarosa-glicina, por la reproducibilidad de sus resultados. Cabe mencionar que la respuesta inmune en la histoplasmosis está bien caracterizada. A la infección temprana aparece la respuesta humoral caracterizada por anticuerpos IgM indicadores de fase aguda, luego surgen IgG precipitantes indicadores de infección temprana, los cuales tienden a decaer a partir de las 5-6 semanas y son sustituidos por anticuerpos IgG fijadores de complemento, que normalmente son monitoreados por los clínicos para seguir el curso de la enfermedad y por lo general, al fin de 6 a 8 meses tienden a desaparecer. La respuesta celular, sin embargo, aparece entre las 2 y 3 semanas y persiste por tiempo indefinido, siendo la responsable de la defensa del hospedero en la histoplasmosis (42).

El estudio del SHOP en pacientes hospitalizados resultó sistemáticamente negativo; considerando que el síndrome es referido como una manifestación tardía, la búsqueda de lesiones retinianas en pacientes con enfermedad activa no es lo más indicado, por lo que el estudio del SHOP se extendió a sujetos que están bajo contacto persistente con el hongo en áreas endémicas. Este estudio además, permitió hacer algunas consideraciones sobre la existencia real de este síndrome en el país. En las áreas endémicas las evidencias de contacto previo con el hongo están dadas fundamentalmente por las respuestas positivas de IDR. El hecho de que los resultados de serología de anticuerpos precipitantes sean negativos en la población, sugiere ausencia de infección activa, sin embargo, la presencia de un nivel mínimo de anticuerpos no considerando a los precipitantes, es un indicador para confirmar el contacto con el hongo, aunque se sabe que la respuesta mediada por células revelada in vivo por la IDR persiste por más tiempo en el hospedero que la "huella" de la respuesta humoral. Por otro lado, también es importante señalar que los resultados del estudio in vitro de transformación linfocítica de células de sujetos que presentaron lesiones en retina aunque no típicas del SHOP, mostraron que la respuesta celular evaluada por este método es variable y no permite relacionar daños en la retina con contacto con el hongo y con desarrollo de respuesta inmune celular al hongo. Algunos de estos sujetos, refirieron haber cursado la enfermedad pulmonar o por lo menos haber tenido contacto con el agente etiológico de la histoplasmosis, por

el tipo de trabajo que profesaban, aun en estos casos no fue posible confirmar clínicamente la presencia del SHOP. Finalmente, se consideró la realización de un muestreo para HLA de la población estudiada, en vista de que el síndrome se había relacionado en población norteamericana con ciertos marcadores de HLA, el B7 y el DRW2.

Dado el tamaño de las poblaciones estudiadas y de la muestra total de sujetos valorados para SHOP, se consideró que un número mínimo de 5-8 individuos de cada población constituía una muestra representativa de la misma para la caracterización de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad.

De todos los individuos estudiados para HLA, 10 de ellos refirieron contacto estrecho y prolongado con H. capsulatum; de ellos se consideraron del cromosoma 6, 20 cromosomas alélicos, así como 14 de 7 individuos que nunca refirieron contacto previo con el hongo. Sin embargo, en ninguno de estos sujetos se encontraron evidencias del SHOP. De los 14 cromosomas de individuos que no refirieron contacto con H. capsulatum, los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad que se encontraron elevados, fueron los del locus A el HLA-A2 (frecuencia génica 0.46 versus 0.27 de controles normales mexicanos), y el A9 (0.46 versus 0.16) (41). En el locus del HLA-B, no hubo diferencias con respecto a normales. Sin embargo, en 6 cromosomas de 3 individuos que tuvieron contacto con el hongo y que desarrollaron un cuadro clínico compatible con histoplasmosis pulmonar, se encontró incrementado el alelo HLA-B22 (frecuencia génica 0.17 versus 0.009) (41). Dicho alelo no estuvo presente en ninguno de los cromosomas de individuos que refirieron contacto y que no desarrollaron la enfermedad, ni tampoco en un grupo de 26 cromosomas de 13 individuos que son provenientes del mismo estrato socioeconómico y que no refirieron contacto con H. capsulatum, siendo que se encontró una diferencia significativa entre los grupos en comparación, con una  $p \leq 0.05$ .

Por otro lado, en las 3 poblaciones estudiadas para el SHOP, se practicaron 253 exámenes clínico-oftalmológicos en la búsqueda del SHOP y no se encontró ningún caso de éste, por lo que se supone que su frecuencia debe ser extraordinariamente baja en individuos mexicanos, y considerando además que el marcador HLA-B7 se presentó en una frecuencia muy baja (0.07 versus 0.05) (41) no se pueden inferir datos concluyentes de su presencia en la población estudiada.

Las evidencias para relacionar al H. capsulatum con el SHOP se basan exclusivamente en datos epidemiológicos de reportes de EUA, ya que no ha sido posible demostrar histopatológicamente al hongo en casos de autopsia de

sujetos donde el síndrome ha sido diagnosticado. Además, los estudios experimentales no siguen la historia natural de la enfermedad y no han reproducido el SHOP en varios modelos animales (43-45).

En los casos descritos en EUA, las respuestas serológicas a antígenos de H. capsulatum fueron regularmente negativas en sujetos con el síndrome, mientras que las de tipo celular fueron positivas en 100% de los casos para la transformación linfocítica y 88% para la intradermorreacción con histoplasmina (16). El hecho de que en Europa, donde no se ha determinado la endemicidad de la histoplasmosis, se describieron sujetos con una entidad nosológica idéntica al SHOP y de que éstos no tenían evidencias clínicas de histoplasmosis previa y que además fueron sistemáticamente negativos a las pruebas de intradermorreacciones con histoplasmina (46), sugiere que el SHOP no es causado por el H. capsulatum.

El presente trabajo aporta evidencias para el planteamiento anterior, ya que realizado en el mismo continente del único país donde se describe el síndrome, utilizando metodologías parecidas y rastreo de marcadores de HLA, no acumula información suficiente para registrar el SHOP en México, sea a través del estudio piloto en población hospitalizada sospechosa de la enfermedad o bien en población abierta procedente de áreas endémicas. Sin embargo, recomendamos que un estudio similar debe extenderse a todos los estados de la república, para confirmar o rechazar el presente planteamiento, ya que la histoplasmosis representa un posible problema de salud pública en el país.

## CONCLUSIONES

Los estudios realizados hasta el momento en las áreas mineras señaladas, permiten sugerir lo siguiente: 1.- Existe posiblemente una alta endemidad en las áreas, sobretudo en Juxtlahuaca, Gro., y Bucareli, Qro., según los resultados de las pruebas intradérmicas con histoplasmina. 2.- En los sujetos estudiados no se encontró evidencia de histoplasmosis activa. 3.- La ausencia de lesiones oculares típicas y la falta de correlación entre respuesta celular a la histoplasmina y daño en retina en sujetos con o sin lesiones, apoyan la aseveración de que el SHOP no existe en estas áreas del país. 4. La ausencia del SHOP en estas poblaciones contrasta con reportes en EUA, lo que sugiere que hay factores étnicos relacionados con la susceptibilidad y resistencia de las formas clínicas de histoplasmosis. 5. Aunque los datos de los grupos de HLA corresponden a una pequeña muestra, y por lo tanto son preliminares, sugieren que el alelo HLA-B22 del complejo principal de histocompatibilidad podría ser un marcador de riesgo para el desarrollo de histoplasmosis pulmonar en individuos mexicanos. 6. Los resultados de inmunogenética descritos en este trabajo sugieren que genes del complejo mayor de histocompatibilidad ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 podrían asociarse a la resistencia o susceptibilidad al desarrollo de las diversas formas clínicas de esta enfermedad. 7. La histoplasmosis pulmonar primaria es la forma clínica predominante de la enfermedad en el país.

**ABSTRACT**

To corroborate the prevalent clinical form of histoplasmosis in Mexico and to identify the Syndrome of Presumed Ocular Histoplasmosis (SPOH), two different populations were studied. For the first case, 325 patients with respiratory problems seen in different hospitals in Mexico City over a 5-year period were studied. Results indicate that only 27 patients (8.3%), from a group of 168 probable cases, were serologically positive to Histoplasma capsulatum antigens, and developed signs and symptoms that were compatible with primary pulmonary histoplasmosis. The second group was made up of the population of 3 areas from Mexico screened for SPOH. Two areas in the states of Guerrero and Queretaro were selected due to their histoplasmosis endemicity, and which are characterized by the presence of several mercury or silver mines. The third one, in Tlaxcala, was considered as a control due to the absence of reported cases of histoplasmosis. A total of 253 individuals were clinically and immunologically studied. Histoplasmin skin test was performed to detect positive reactors, which were submitted to ocular fundus examination to obtain evidence of the syndrome. Only 5 individuals presented retinal lesions, although these were not characteristic of the syndrome. Immunological studies to detect the response of lymphocyte stimulation with specific antigen, by the lymphocyte transformation test (LT), showed different patterns in the histoplasmin-induced lymphocyte transformation response, and 2 of 5 individuals with retinal lesion presented a positive response, as well as 3 controls without lesions. Histocompatibility leucocyte antigens (HLA) determination was performed in a small sample of each population studied and did not show a high frequency of a particular allele, however, HLA-B22 was found in 3 individuals who developed pulmonary histoplasmosis. Results corroborate primary pulmonary histoplasmosis as the predominant form of the disease in the country and SPOH was not detected in the population studied.

## BIBLIOGRAFIA

1. Velasco-Castrejón, O., González-Ochoa, A. Primary pulmonary epidemic Histoplasmosis in an abandoned mine. *Mykosen*, 20, 393-399, 1977.
2. González-Ochoa, A. Epidemiología de la histoplasmosis primaria en México. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Mex.)*, 23, 65-80, 1963.
3. Velasco-Castrejón, O. Aspectos epidemiológicos de la histoplasmosis en México. *Rev. Inv. Salub. Pub.* 95-97, 1985.
4. Emmons, C. W., Binford, C. H., Utz, J. P., Kwon-Chung, K. J. *Histoplasmosis. Medical Mycology* 3rd ed. Lea & Febiger. pp. 305-341, 1977. Philadelphia.
5. Velasco-Castrejón, O. Quelques aspects de l'histoplasmosis en Republique Mexicaine. *Med. Tropicale*, 41, 681-683, 1981.
6. Verduzco-Guerrero, E., Portales, A. Histoplasmosis. Estudio de conjunto y de un brote epidémico en la Comarca Lagunera. *Bol. Epidemiológico*, 26, 73-83, 1962.
7. González-Ochoa, A. Relaciones entre el habitat del murciélago y el Histoplasma capsulatum. *Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop. (Méx.)*, 23, 81-86, 1963.
8. Velasco-Castrejón, O., Fujiguki-Lechuga, A. Importancia de la histoplasmosis pulmonar primaria en trabajadores de minas en México. *Neumol. Cir. Tórax*, 45, 7-9, 1984.
9. Velasco-Castrejón, O., Taylor, M. L., Toriello, C., Guzmán-Bracho, C., Vallejo, O. Conducta de la histoplasmosis pulmonar primaria en México durante 1985. Informe anual de actividades 1985. Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Epidemiología, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. pp. 95-97, 1986.
10. Youmans, G. P. Paterson PY, Sommers HM. Histoplasmosis, Coccidioidomycosis, Blastomycosis. In: Youmans, G. P., Paterson, P. Y., Sommers, H. M. (Eds.). *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*. Saunders, W. B. Co. pp.404-427, 1980. Philadelphia.
11. Woods, A. C., Wahlen, H. E. The probable role of benign histoplasmosis in the etiology of granulomatous uveitis. *Amer. J. Ophthalmol.*, 49, 205-220, 1960.

12. Van Metre, T. E., Maumenee, A. E. Specific ocular uveal lesions in patients with evidence of histoplasmosis. Arch. Ophthalmol., 71, 314-324, 1964.
13. Schlaegel, T. F., Kenney, D. Changes around the optic nervehead in presumed ocular histoplasmosis. Amer. J. Ophthalmol., 62, 454, 1966.
14. Link, S. G. Absence of so-called histoplasma uveitis in 134 cases of proven histoplasmosis. Arch. Ophthalmol., 77, 41-44, 1967.
15. Ganley, J. P. Epidemiology of Presumed Ocular Histoplasmosis. Arch. Ophthalmol., 102, 1754-1756, 1984.
16. Check, I. J., Diddie, K. R., Jay, W. M., Merker, R., Hunter, R. L. Lymphocyte stimulation by yeast phase Histoplasma capsulatum in presumed ocular histoplasmosis syndrome. Amer. J. Ophthalmol., 87, 311-316, 1979.
17. Meredith, T. A., Smith, R. E., Braley, R. E., Witkowski, J. A., Koethe, S. M. The prevalence of HLA-B7 in presumed ocular histoplasmosis in patients with peripheral atrophic scars. Amer. J. Ophthalmol., 86, 325-328, 1978.
18. Godfrey, W. A., Sabates, R., Cross, E. D. Association of presumed ocular histoplasmosis with HLA-B7. Amer. J. Ophthalmol., 85, 854-858, 1978.
19. Meredith, A. T., Smith, R. E., Duquesnoy, R. J. Association of HLA-DRw2 antigen with presumed ocular histoplasmosis. Amer. J. Ophthalmol., 89, 70-76, 1980.
20. Wulf, A., Saraiva, P. J., Neumann, J. M., Morales, E. K., Bopp, C., Jobim, L. F. HLA e cromoblastomicose. Alergia e Imunopatologia, 2, 175,
21. Tsuneto, L. T., Arce-Gómez, B., Petzl-Erler, M. L., Queiroz Tedlles, F. HLA-A29 and susceptibility to chromoblastomycosis. J. Med. Vet. Mycol., 27, 181-185, 1989.
- 22.- Restrepo, F. M., Restrepo, M., Restrepo, A. Blood groups and HLA antigen, in paracoccidioidomycosis. Sabouraudia, 21, 35-39, 1983.
- 23.- Lacerda, G. B., Arce-Gómez, B., Queiroz-Tedlles, F. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. J. Med. Vet. Mycol., 26, 253-256, 1988.

24. Scheer, M., Opelz, G., Terasaki, P., Hewitt, W. The association of disseminated coccidioidomycosis and histocompatibility type. 13th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. Abstract no. 157, 1973, Washinton, D. C.
25. Deresinski, S. C., Pappagianis, D., Stevens, D. A. Association of ABO blood group and outcome of coccidioidal infection. *Sabouraudia*, 17, 261-264, 1979.
26. Becerril, M., Acosta, G., Casasola, J., Reborá-Gutiérrez, F., Díaz-Gómez, M. L., Velasco-Castrejón, O., Taylor, M. L., Toriello, C. Investigación de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. *Rev. Mex. Mic.*, 1, 211-226, 1985.
27. Taylor, M. L., Reyes-Montes, M. R., Lachica, A., Eslava-Campos, C., Olvera, J., Maxwell, R. Immunology of Histoplasmosis: Humoral And Cellular Activity From A Polysaccharide Protein Complex And Its Deproteinized Fraction In Experimentally Immunized Mice. *Mycopathologia*, 71, 159-166, 1980.
28. Reyes-Montes, M. R., Martínez, A., Toriello, C., Taylor, M. L. Antigens from Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. I. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of both fungi. *Mycopathologia*, 78, 17-23, 1982.
29. Casey, H. L. Part II. Adaptation of LBCF Method to Microtechnic. In: Public Health Service Publication No 1228 (ed.). Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro test. 1965. Washintong D. C.
30. Ouchterlony, Ö. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: Kalles, P., Wakesman, B. H. (Eds.). Progress in Allergy. Vol VI. pp. 30-154, 1962. Basel.
31. Jiménez-Montiel, J. A., Taylor, M. L., Toriello, C. Efecto del tratamiento con  $\alpha$  y  $\beta$  galactosidasas en antígenos de hongos productores de micosis profundas. *Bioquimia*, I/1, 13-18, 1988.
32. Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Europe Laboratories Inc. pp. 35-41, 1979. London.

33. Haneberg, B., Wesenberg, F., Aarskog, D. Lymphocyte multiplication in vitro induced by mitogens and antigens. *Scand. J. Immunol.*, 8, 9-13, 1978.
34. Bodmer, W.F., Batchelor, J. R., Bodmer, J. G., Festenstein, H., Morris, P. J. (Eds.) *Histocompatibility Testing*. 1977. Munksgaard, pp. 612, 1978. Copenhagen.
35. Siegel, S. Estadística no-paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Trillas. pp. 240, 1977. México, D. F.
36. Arellano, J., Vallejo, M., Gómez, E. H., Kretschmer, R. R. HLA profile of the Mexican Mestizo population. *Tissue Antigens*, 18, 242-246, 1981.
37. Sepúlveda Amor, J., Bronfman, M., Ruíz-Palacios, G., Stanislawski, E., Valdespino, J. L. Sida. Ciencia y Sociedad en México. Fondo Cultura Económica. Colección Biblioteca de la Salud. 1989. México, D. F.
38. Kovacs, J. A., Masur, H. Opportunistic Infections. In: Devita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A. (Eds). *AIDS. Etiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention*. 2dn. ed. Lippincott, J. B. Co. pp. 199-225, 1988. Philadelphia.
39. Minamoto, G., Armstrong, D. Fungal Infections in AIDS. Histoplasmosis and Coccidioidomycosis. In: Sande, M. A., Volberding, P. A. (Eds). *The Medical Management of AIDS*. Saunders, W. B. Co. pp. 213-223, 1988. Philadelphia.
40. Toriello, C., Arjona-Rosado, L. C., Díaz-Gómez, Taylor, M. L. Efficiency of crude and purified antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses*, 34, 133-140, 1991
41. Weckman, G. A. L. Frecuencia de Haplotipos del Sistema Principal de Histocompatibilidad y su Desequilibrio Genético en la Población Normal Mestiza Mexicana. Tesis de Licenciatura para el grado de Bióloga. Facultad de Ciencias, UNAM. 1990. México, D. F.
42. Taylor, M. L., Díaz, S., González, P. A., Sosa, A. C., Toriello, C. Relationship Between Pathogenesis and Immune Regulation Mechanisms in Histoplasmosis: A Hypothetical Approach. *Rev. Infect. Dis.*, 6, 775-782, 1984.
43. Gass, J. D. M. Stereoscopic atlas of macular diseases. Diagnosis and treatment. 3rd ed. C. V. Mosby Co. pp. 112-128, 1987. St. Louis.

44. Smith, J. L., Singer, J. A. Experimental Ocular Histoplasmosis. III. Experimentally Produced Retinal and Choroidal Lesions. Amer. J. Ophthalmol., 58, 413-423, 1964.
45. Jester, J. V., Smith, R. E. Subretinal Neovascularization After Experimental Ocular Histoplasmosis in a Subhuman Primate. Amer. J. Ophthalmol., 100, 252-258, 1985.
46. Braunstein, R. A., Rosen, D. A., Bird, A. C. Ocular histoplasmosis syndrome in the United Kingdom. Brit. J. Ophthalmol., 58, 893-898, 1974.

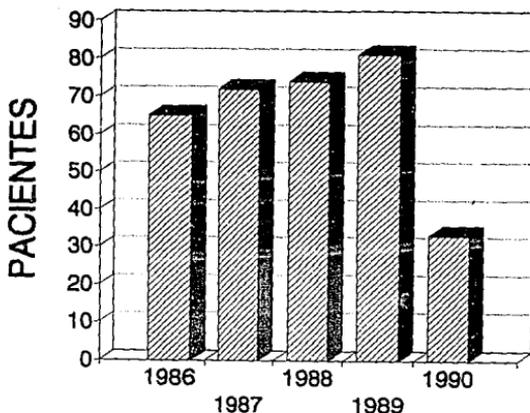


Fig. 1. Inmunodiagnóstico para micosis en un período de 5 años (1986-1990). Se procesaron muestras de pacientes de diferentes hospitales para enfermedades respiratorias en la ciudad de México. Se tomaron en cuenta sólo las muestras serológicas de pacientes con evidencia clínica de micosis sistémicas. Las solicitudes de inmunodiagnóstico fueron dirigidas al laboratorio de Inmunología de hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

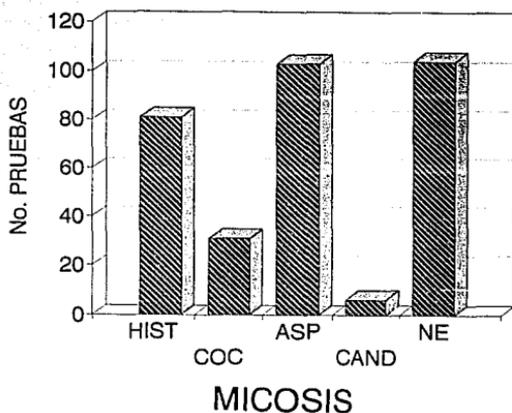


Fig. 2. Número de muestras serológicas procesadas para cada micosis. Se consideró un total de 325 pacientes, en un período de 5 años. Hist=histoplasmosis, Coc=coccidioidomicosis, Asp=aspergilosis, Cand=candidosis, NE=micosis donde no se especificó el diagnóstico clínico presuntivo.

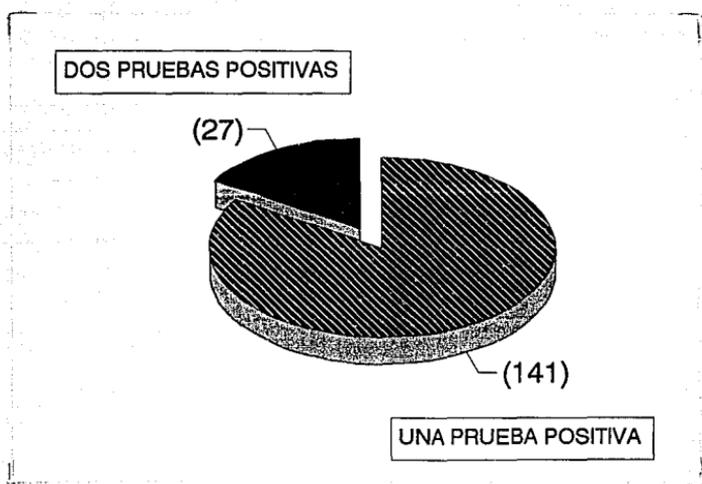


Fig. 3. Número de casos de histoplasmosis pulmonar presuntiva valorados serológicamente. Se consideraron un total de 168 pacientes con el mínimo de una prueba serológica positiva para antígeno de H. capsulatum.

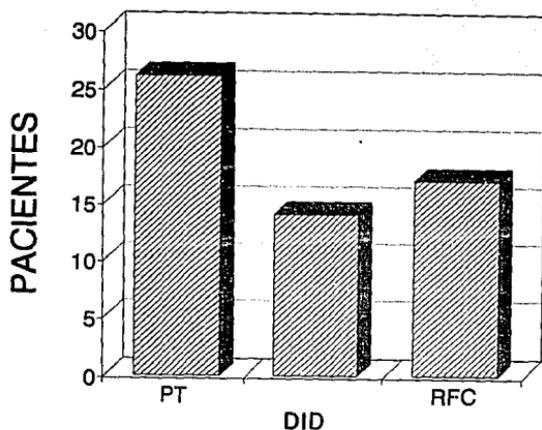


Fig. 4. Pruebas serológicas positivas en pacientes con inmunodiagnóstico de histoplasmosis pulmonar. Se consideraron 27 pacientes con base en 2 pruebas positivas, seleccionados de un total de 168 considerados con histoplasmosis presuntiva.

PT: precipitación en tubo capilar; DID: doble inmunodifusión en gel; RFC: reacción de fijación de complemento.

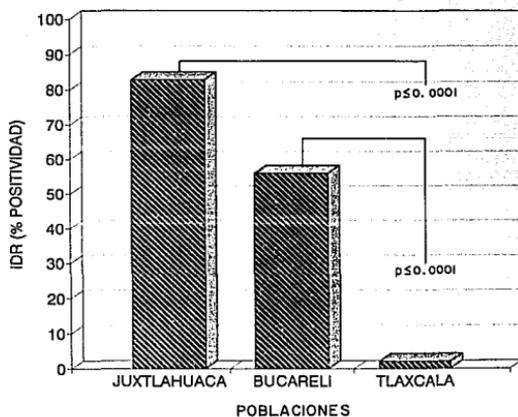


Fig. 5. Porcentajes de intradermorreacción (IDR) positiva a la histoplasmina en las poblaciones estudiadas para el SHOP. La IDR se realizó en los 253 individuos mencionados en la tabla 1 y se practicó por la inyección intradérmica en el antebrazo izquierdo de 0.1 ml de histoplasmina a una concentración de 10  $\mu\text{g}$  de proteína. (Ver detalles en Materiales y Métodos).

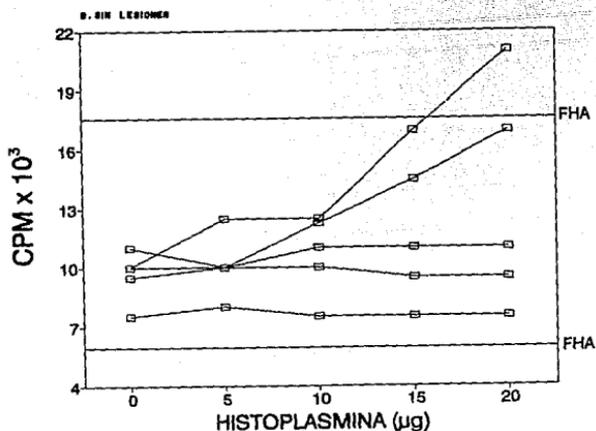
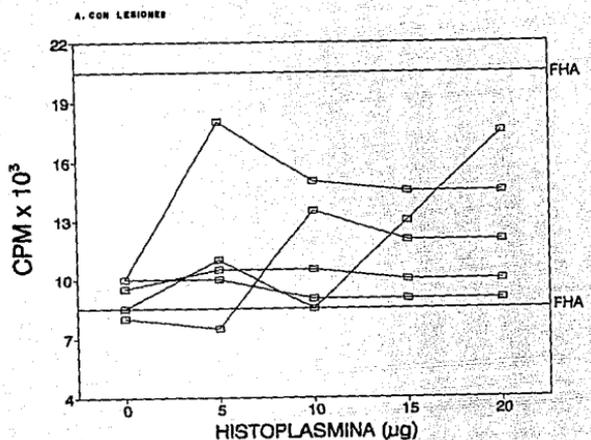


Fig. 6 (A, B). Transformación linfocítica al antígeno histoplasmina en una muestra de una población localizada en una área endémica de histoplasmosis. A) Sujetos que presentaron lesiones retinianas. B) Sujetos sin lesiones retinianas. Las respuestas a la FHA, utilizada como testigo de estimulación celular, se ilustran en las respectivas figuras, con los valores de estimulación máximo y mínimo de cada grupo.

TABLA 1

**POBLACION DE INDIVIDUOS ESTUDIADOS PARA EL SHOP EN  
LAS AREAS ENDEMICAS DE HISTOPLASMOSIS**

POBLACION	No. INDIVIDUOS SEXO		TOTAL
	F	M	
Juxtlahuaca Gro.	38	44	82
Bucareli Gro.	57	16	73
Tlaxcala Tlax.	64	34	98
Totales	159	94	253

**TABLA 2**  
**RESULTADO DE HLA DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS EN**  
**JUXTLAHUACA, GRO.**

INDIVIDUOS	HLA
1. HNJ	A2 A9 B35 B47 CW4
2. AHN	A3 A9 B21 B35 CW2
3. MOJ	A2 A10 B21 CW10
4. EOJ	A2 B18 B41 CW7
5. MJH	A2 A28 B7 B18 CW3 CW7
6. CJ	A2 B7 B40 CW3
7. AJA	A2 A9 B7 B40 CW3 CW7
8. FHT	A2 A9 B18 B35 CW4 CW10

TABLA 3  
RESULTADOS DE HLA DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS EN  
BUCARELI, QRO.

INDIVIDUOS	HLA
1. HHJ	A2 B16 B22 CW5
2. HMA	A2 A9 B73 B14
3. SVG	A9 A19 B12 B22 (B40)
4. FGV	A9 A10 B22 B21
5. AA	A36 A10 B5 B15 B16

TABLA 4

RESULTADOS DE HLA DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS EN  
TLAXCALA, TLAX.

INDIVIDUOS	HLA
1. HS	A3 A28 B5 B15 CW1 CW2
2. DFH	A2 A28 B16 B40
3. GCF	A9 A28 B15 B67 CW7 CW8
4. JFF	A2 A19 B15 B16 CW1 CW6
5. FMM	A3 A19 B5 B35 CW4
6. MPC	A19 A10 B18 B48
7. MAM	A19 B5 B16 CW4 CW7
8. MBM	A2 A19 B40
9. BFM	A28 A19 B5 B16 CW7
10. CCM	A2 A28 B16 B5 CW4 CW7

TABLA 5

HLA DE LOS INDIVIDUOS CON Y SIN CONTACTO PREVIO CON  
Histoplasma capsulatum DE LAS 3 POBLACIONES ESTUDIADAS

CONTACTO		SIN CONTACTO	
INDIV.	HLA	INDIV.	HLA
HNJ	A2 A9 B35 B47 CW4	MJH	A2 A28 B7 B18 CW3 CW7
AHN	A3 A9 B21 B35 CW2	CJ	A2 B7 B40 CW3
MOJ	A2 A10 B21 CW10	HS	A3 A28 B5 B15 CW1 CW2
EOJ	A2 B18 B41 CW7	DFH	A2 A28 B16 B40
AJA	A2 A9 B7 B40 CW3 CW7	GCF	A9 A28 B15 B67 CW7 CW8
FHT	A2 A9 B18 B35 CW4 CW10	JFF	A2 A19 B15 B16 CW1 CW6
HHJ	A2 B16 B22 CW5	FMM	A3 A19 B5 B35 CW4
HMA	A2 A9 B73 B14	MPC	A19 A10 B18 B48
SVG	A9 A19 B12 B22 (B40)	MAM	A19 B5 B16 CW4 CW7
FGV	A9 A10 B22 B21	MBM	A2 A19 B40
		BFM	A28 A19 B5 B16 CW7
		CCM	A2 A28 B16 B5 CW4 CW7
		AA	A36 A10 B5 B15 B16

INDIV=individuos.