



## Caso clínico

# Problemas clínicos en Micología Médica: problema número 55

## Clinical problems in Medical Mycology: problem number 55



Mercedes Romero<sup>a,\*</sup>, Fernando Messina<sup>a</sup>, Roxana Depardo<sup>a</sup>, Emmanuel Marín<sup>a</sup>, Alicia Arechavala<sup>a</sup>, Nicolás Lista<sup>b</sup>, Alejandra Rodríguez<sup>b</sup> y Gabriela Santiso<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Micología, Hospital de Infectos F. J. Muñiz, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Unidad de Terapia Intensiva, Hospital de Infectos F. J. Muñiz, Buenos Aires, Argentina

## ABSTRACT

A 31-year-old woman, with signs of HIV infection (oral thrush, weight loss, asthenia) presented to our hospital with dyspnea and fever. A rapid HIV test yielded a positive result, and cryptococcal capsular antigen was detected in serum. In the mycological study of the clinical respiratory samples, yeasts compatible with *Cryptococcus* were observed under light microscope in a wet mount; structures compatible with *Pneumocystis jirovecii* were also observed in Giemsa stain. Treatment for both pathologies was prescribed but, unfortunately, the patient died 7 days after. The finding of two etiologic agents in the same clinical picture is rare but not exceptional, and it always must be considered in immunocompromised hosts.

© 2020 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Paciente de 31 años y sexo femenino que nació y vivió en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, en vivienda con sanitarios completos y necesidades básicas satisfechas. Refirió haber realizado viajes a la costa atlántica (provincia de Buenos Aires). Fue fumadora de 10 cigarrillos al día desde los 18 hasta los 30 años. No consumía alcohol. Como antecedentes acerca de su estado de salud solo dijo haber padecido varicela en la infancia. Acudió a la consulta por disnea clase funcional II/III de 3 semanas de evolución y fiebre durante los últimos 3 días.

## Examen físico

La paciente estaba adelgazada, manifestaba una marcada astenia, las conjuntivas estaban hipocoloreadas y las fauces presentaban membranas blanquecinas entre el paladar duro y el blando. Estaba lúcida, orientada en tiempo y espacio, y sin signos de foco motor ni meníngeo. La tensión arterial era 110-60 mm Hg, la frecuencia cardíaca 108 latidos/min, la frecuencia respiratoria 27 respiraciones/min, y la temperatura axilar 38,2 °C. En el examen cardiovascular los ruidos eran normofónicos y no se auscultaban soplos. La mecánica ventilatoria era buena, con hipovenitilación en ambos hemitórax sin ruidos agregados; ambos hemitórax eran sonoros a la percusión. A la palpación el abdomen se encontraba blando, indoloro, no se notaban visceromegalias y los ruidos hidroáreos eran normales.



Figura 1. Radiografía de tórax.

## Estudios por imágenes

En la radiografía de tórax se observó el patrón retículo-intersticial bilateral que puede verse en la figura 1.

Se realizó, además, una tomografía axial computarizada sin contraste de tórax que evidenció un patrón intersticial en vidrio esmerilado generalizado con algunas zonas de hiperclaridad y engrosamiento de septos interlobulillares (fig. 2).

## Estudios complementarios de laboratorio

Eritrosedimentación 88 mm en la primera hora, hematocrito 33%, hemoglobina 10,6 g/dl, plaquetas 294.000/μl, leucocitos

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [mecharomero@gmail.com](mailto:mecharomero@gmail.com) (M. Romero).



Figura 2. TAC de tórax sin contraste. Plano transversal.

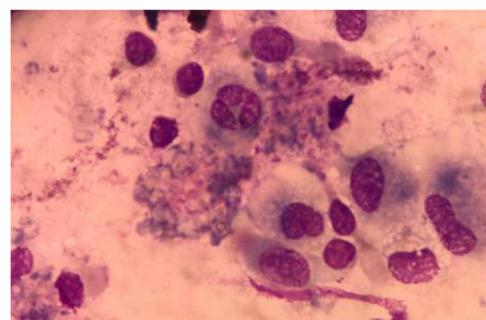


Figura 4. Preparación con Giemsa (1000×).

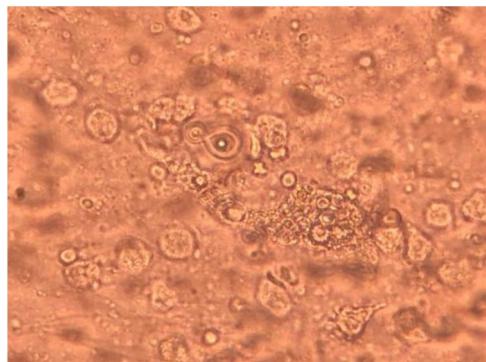


Figura 3. Examen en fresco de LBA (400×).

7.300/ $\mu$ l (neutrófilos 85,3%, linfocitos 9,6%, monocitos 3,9%, eosinófilos 0% y basófilos 0,1%), transaminasa glutámico-oxalacética 27 U/l, transaminasa glutámico-pirúvica 21 U/l, fosfatasa alcalina 202 U/l, glucosa 112 mg/dl, urea 16 mg/dl, creatinina 0,5 mg/dl, lactato deshidrogenasa 1.040 U/l, creatina-fosfoquinasa 34 U/l, procalcitonina 0,29 ng/ml, sodio 138 mEq/l, potasio 5,6 mEq/l, cloruros 97 mEq/l. Estudio de gases en sangre:  $\text{pFiO}_2$  21%; pH 7,44;  $\text{pCO}_2$  32,4 mm Hg;  $\text{pO}_2$  55,3 mm Hg; BE -2,2 mmol/l;  $\text{HCO}_3$  22,4 mmol/l; saturación  $\text{O}_2$  92%.

Se realizó una prueba rápida para la detección del VIH que resultó positiva. Otras pruebas serológicas fueron la búsqueda de anticuerpos para la enfermedad de Chagas, de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, y marcadores de las hepatitis B y C; todas estas pruebas fueron no reactivas. Además, se realizó una inmunocromatografía (IC) para la detección de antígeno capsular de *Cryptococcus* (CrAg) en suero, que fue positiva, y se realizó la titulación por aglutinación de partículas de látex, que fue negativa. El recuento de linfocitos T fue el siguiente: CD<sub>4+</sub> 13 cél/ $\mu$ l, CD<sub>8+</sub> 363 cél/ $\mu$ l y CD<sub>3+</sub> 394 cél/ $\mu$ l. Se realizaron hemocultivos para bacterias, micobacterias y hongos, que resultaron negativos. Se realizó el examen microbiológico del líquido cefalorraquídeo (examen directo con tinta china, coloración de Gram y cultivo en medios para bacterias y hongos), que no arrojó ningún dato.

La paciente fue sometida a un lavado broncoalveolar (LBA); sobre la muestra obtenida se realizaron estudios microbiológicos para bacterias, micobacterias, virus y parásitos, que arrojaron resultados negativos. Con el examen micológico de esta muestra, sin embargo, se llegó al diagnóstico de coinfección de dos patógenos mediante el examen directo en fresco y la coloración de Giemsa (figs. 3 y 4). Posteriormente, en el cultivo se aisló uno de los agentes etiológicos observados previamente (fig. 5). Mediante la técnica de PCR se buscó la presencia en la muestra de LBA de *Pneumocystis jirovecii* e *Histoplasma capsulatum*; el resultado fue positivo para el primero y negativo para el segundo. Se prescribió tratamiento



Figura 5. Cultivo.

específico para las dos enfermedades oportunistas diagnosticadas, además de oseltamivir (75 mg/día). Lamentablemente, la paciente evolucionó desfavorablemente y falleció al cabo de 7 días.

### Preguntas

- 1) Teniendo en cuenta el cuadro clínico y los resultados de laboratorio junto con las imágenes, ¿cuáles son los diagnósticos más probables? ¿Qué estudios realizaría para certificar esos diagnósticos?
- 2) La antigenemia para *Cryptococcus* por IC resultó positiva, ¿qué información da este resultado? ¿A qué podría deberse la discordancia entre los resultados obtenidos por la técnica de IC y los de aglutinación de partículas de látex? ¿Qué conducta tomaría? ¿En qué pacientes se recomienda realizar la búsqueda temprana de CrAg por IC?
- 3) Tras realizar el LBA se procesó el material y en la microscopía se observó lo que se muestra en las figuras 3 y 4. ¿Qué estructuras reconoce? ¿Cuál es el diagnóstico? ¿Cuál de los patógenos se obtuvo en el cultivo y cómo se puede realizar la tipificación de dicho patógeno?
- 4) ¿Qué valor les adjudica a los métodos moleculares como herramientas diagnósticas?
- 5) ¿Cuál o cuáles serían los tratamientos de elección? ¿Cuál es el momento adecuado para dar inicio a la terapia antirretroviral (TARV) y por qué?

### Respuestas

1. La evaluación clínica evidenció una paciente cuyo estado general se encontraba muy deteriorado, con signos de muguet (afección marcadora y primera en frecuencia entre las micosis en enfermos con sida) y mal estatus inmunológico, que se confirmó mediante los estudios de laboratorio, sumado al compromiso pulmonar que se observó en las imágenes. Los diagnósticos

posibles son múltiples, los más probables serían tuberculosis, neumocistosis, criptococosis e histoplasmosis por su frecuencia y por su tropismo por el sistema respiratorio. En el contexto actual, también debería pensarse en infección por SARS-CoV-2 y en época invernal por el virus de influenza. Para confirmar el diagnóstico se debe realizar el examen microbiológico de muestras respiratorias y hemocultivos por lisis-centrifugación. Además, en un paciente con estas características se debe realizar antigenemia de *Cryptococcus* (por IC) y la detección del antígeno de *Histoplasma* (ELISA) en orina. En lo que respecta a la tuberculosis, además de la baciloscopía y el cultivo se utiliza la detección molecular de micobacterias en muestras respiratorias (GEN Xpert® MTB/RIF), que es más sensible y permite iniciar un tratamiento precozmente.

2. La detección de CrAg por IC indica la presencia de *Cryptococcus* y, por lo tanto, existe riesgo de progresión a una criptococosis meníngea. Es una herramienta de diagnóstico temprano que permite aplicar medidas preventivas en el paciente, ya que el CrAg puede detectarse incluso semanas antes de la aparición de los síntomas. Las concentraciones más altas del CrAg se detectan en la criptococosis diseminada y su titulación es útil para el seguimiento de esta micosis. La IC está validada para el diagnóstico de enfermedad en suero, plasma y sangre entera. Diversos autores destacan que para la detección temprana del CrAg circulante el uso de sangre entera no tiene tan buena sensibilidad como el uso del suero. Dicha prueba es más sensible que la aglutinación por partículas de látex, por lo cual pueden existir resultados discordantes. El límite de detección de la IC es de 1 ng/ml y varios estudios postulan que su sensibilidad llegaría al 100%. Puede haber falsos negativos, ya sea por baja carga fúngica, cepas pobemente capsuladas o por el efecto prozona, y también falsos positivos, que deben sospecharse cuando al realizar la cuantificación se obtienen títulos menores de 1:10 y no existen otros elementos clínicos o microbiológicos sugestivos de criptococosis<sup>3</sup>. Ante una prueba de IC positiva para CrAg se debe titular el CrAg y realizar una punción lumbar para descartar un compromiso meníngeo. En base a estos resultados se instaura el tratamiento para la criptococosis en el caso de su diagnóstico, o una terapia preventiva en caso negativo. Además, deben realizarse hemocultivos (lisis-centrifugación o métodos automatizados) útiles para detectar criptococcemia. Si se descarta el compromiso del sistema nervioso central, se continúa con fluconazol 800 mg/día (su uso mejora la supervivencia) hasta obtener hemocultivos o cultivos de otros materiales clínicos negativos para este microorganismo. Si todos los resultados son negativos se continúa con tratamiento preventivo (pre-emptive therapy), de lo contrario se rota al tratamiento recomendado para la criptococosis y se adapta según el o los órganos comprometidos. Actualmente, la propuesta más aceptada de tratamiento preventivo es el fluconazol, 800 mg/día durante dos semanas, y después 400 mg/día durante 4 semanas, y se comenzaría TARV a las dos semanas. En el caso de títulos superiores a 1/160 por la técnica de IC la indicación sería fluconazol 1200 mg/día durante 4 semanas, después 400 mg/día durante 8 semanas y por último seis meses más con 200 mg diarios<sup>7</sup>. La detección temprana de CrAg por IC se recomienda en los pacientes con sida con recuentos de linfocitos T CD4+ inferiores a 200 cél./μl, asintomáticos y sin antecedentes de criptococosis con el objeto de detectar precozmente o prevenir la criptococosis meníngea.
3. En la preparación microscópica en fresco de la figura 3 se observan levaduras capsuladas compatibles con *Cryptococcus*. Si bien su hallazgo en el cultivo de estas muestras no es diagnóstico de la criptococosis, ya que ocasionalmente podrían encontrarse como colonizadores transitorios, en este caso se observó en el examen directo en fresco. Dado que se trataba de una paciente VIH+ de reciente diagnóstico con una prueba positiva de CrAg en suero,

su hallazgo completó el diagnóstico de criptococosis. La figura 4 muestra una preparación microscópica coloreada con Giemsa en la que se observan las ascosporas inmersas en la estructura de exudado espumoso típico de *P. jirovecii*. En el caso de este patógeno, el examen directo es el estándar de oro para el diagnóstico de certeza de la neumocistosis pulmonar, ya que es un microorganismo no cultivable. La paciente presentaba, entonces, criptococosis y neumocistosis. Es importante tener presente que en pacientes inmunocomprometidos no es excepcional la presencia concomitante de diversas patologías, sea en el mismo o en diversos órganos blanco. El patógeno obtenido en el cultivo del LBA fue *Cryptococcus*. Este hongo crece en los medios tradicionales de cultivo micológico como colonias glabras, cremosas, blancas o beige. Las pruebas básicas para la confirmación del género son la capacidad de crecimiento a 37 °C, la producción de ureasa en medio de Christensen y la producción de fenoloxidasa, que se evidencia por el crecimiento de colonias de color marrón en el agar semillas de girasol. La capacidad de crecimiento en los medios de Salkin y glicina-canavanina-azul de bromotimol permiten la diferenciación entre especies de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. La amplificación por PCR del gen Ura5 seguida de digestión enzimática y análisis de los polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP) sirve para definir el genotipo<sup>5</sup>. En este caso el aislamiento se identificó como *C. neoformans* genotipo VNII.

4. *Pneumocystis jirovecii* es un hongo con marcado estenoxenismo que parasita de forma pericelular los neumocitos y que requiere, por su localización, de profesionales altamente entrenados para su observación. Desde hace varios años el uso de técnicas moleculares para su detección es controvertido por la sospecha de que por la alta sensibilidad de la técnica no permitiría diferenciar colonización de infección. En nuestra experiencia en el uso de PCR anidada, si se considera el examen directo positivo como verdadero positivo, la sensibilidad de la PCR es del 95,7%, la especificidad del 88,7%, el valor predictivo positivo (VPP) del 52,9% y el valor predictivo negativo (VPN) del 99,4% (datos no publicados). En concordancia con la bibliografía, la PCR anidada muestra una buena sensibilidad y especificidad pero se destaca especialmente por su alto VPN. Por lo tanto, es una técnica útil como complemento de las técnicas de observación directa y cuyo resultado debe interpretarse en el contexto clínico del paciente. Su utilidad toma valor también al considerar que la neumocistosis pulmonar puede presentarse con un cuadro clínico que se solapa con otras entidades. Con respecto al uso de PCR para la detección de ADN de *Histoplasma*, en nuestra experiencia en el uso de PCR anidada en sangre entera hemos obtenido resultados con una sensibilidad del 82%, especificidad del 97%, VPP del 95,4% y VPN del 87,7% (datos no publicados). La técnica muestra una buena sensibilidad y especificidad, y destaca por su alto VPP. Es una técnica útil para su implementación como complemento de las técnicas convencionales, pero siempre debe tenerse en cuenta el estado clínico e inmunológico del paciente. No tiene un buen desempeño en pacientes inmunocompetentes ni tampoco en histoplasmosis de localización exclusivamente pulmonar. Junto con la determinación del antígeno galactomanano de *H. capsulatum* en orina, constituyen los métodos más eficientes y rápidos para el diagnóstico de esta patología.
5. La criptococosis pulmonar grave en enfermos inmunocomprometidos debe ser tratada, en principio, igual que la criptococosis meníngea<sup>6</sup>. Se comienza con un tratamiento combinado: anfotericina B desoxicolato 0,7 mg/kg/día o anfotericina B liposomal 3 mg/kg/día o anfotericina B complejo lipídico 5 mg/kg/día + 5-fluorocitosina 100 mg/kg/día dividida en 4 tomas. En caso de no contar con este último medicamento puede prescribirse fluconazol 1200 mg/día o la combinación anfotericina B desoxicolato 0,7 mg/kg/día + fluconazol 800 mg/día durante la

inducción. En los casos de criptococosis pulmonar leve o moderada sin otro compromiso puede prescribirse tratamiento con fluconazol 800 mg/día u otro azol. Debe mantenerse el fluconazol a esa dosis durante 8 a 12 semanas según la evolución y después continuar con profilaxis secundaria con fluconazol (200 mg/día) hasta obtener dos recuentos de linfocitos T CD4+ superiores a 150 cél./μl con carga viral del VIH inferior a 20 copias/ml; se recomienda sostener la profilaxis por lo menos hasta completar un año. Una vez descartado el compromiso meníngeo puede cambiarse el fluconazol por otro azol que alcance buena concentración en pulmón, como el itraconazol o el isavuconazol.

Para la neumocistosis asociada al sida la primera elección es la trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) endovenosa (80/400 mg cada ampolla). Si la presión de oxígeno en sangre arterial es inferior a 70 mm Hg debe calcularse una dosis de trimetoprima de 15 mg/kg/día junto a 40 mg de prednisona cada 12 h. Tras 21 días de tratamiento se pasa a una profilaxis secundaria con TMS (160/800 mg/día, tres veces por semana) también hasta obtener dos recuentos de linfocitos T CD4+ superiores a 150 cél./μl con carga viral para el VIH inferior a 20 copias/ml. Como alternativa terapéutica en casos de alergia se puede utilizar pentamidina endovenosa 4 mg/kg/día, o primaquina 30 mg vía oral + clindamicina endovenosa 600 mg cada 6 h<sup>1</sup>. Se ha sugerido que las equinocandinas podrían ser útiles, pero aún no hay estudios prospectivos a doble ciego en humanos que permitan cierta seguridad al respecto. Algunas publicaciones mencionan que su acción se limita a ciertos momentos del ciclo replicativo dado que las formas que no se replican o aberrantes podrían no expresar en su pared los β-1,3-D-glucanos<sup>2</sup>. Los estudios realizados en ratones sugieren no utilizar las equinocandinas como monoterapia, aunque han demostrado que su combinación con TMS podría ser de utilidad<sup>4</sup>. Con respecto al inicio de la TARV, en

la neumocistosis puede prescribirse tan pronto el enfermo esté en condiciones de recibir medicación por vía oral; en la criptococosis puede hacerse una vez se haya descartado el compromiso meníngeo, para lo cual debe esperarse al resultado de los cultivos de LCR (al menos dos semanas). En los casos de meningitis debe esperarse como mínimo 4 semanas para comenzar la TARV. A mayor carga fúngica inicial en el LCR, mayor probabilidad de aparición del síndrome de reconstitución inmune.

## Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Panel on Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in adults and adolescents with HIV; 2019.
2. Cushion MT, Ashbaugh A, Hendrix K, Linke M, Tisdale N, Sayson S, et al. Gene expression of *Pneumocystis murina* after treatment with anidulafungin results in strong signals for sexual reproduction, cell wall Integrity, and cell cycle arrest, indicating a requirement for ascus formation for proliferation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e02513–2517, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02513-17>.
3. Dubbels M, Granger D, Theel ES. Low *Cryptococcus* antigen titers as determined by lateral flow assay should be interpreted cautiously in patients without prior diagnosis of cryptococcal infection. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2472–9, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00751-17>.
4. Lobo ML, Esteves F, de Sousa B, Cardoso F, Cushion M, Antunes F, et al. Therapeutic potential of caspofungin combined with trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis* pneumonia: a pilot study in mice. *PLoS One*. 2013;8:e70619, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070619>.
5. Santiso G, Marin E, Arechavala A, Romero M, Messina F, Negroni R, et al. Epidemiología molecular de la criptococosis en un hospital de enfermedades infecciosas de la ciudad de Buenos Aires: análisis de 25 años. *Pren Med Argent*. 2018;104:510–5.
6. Skolnik K, Huston S, Mody CH. Cryptococcal lung infections. *Clin Chest Med*. 2017;38:451–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.007>.
7. Vidal JE, Toniolo C, Paulino A, Colombo A, Dos Anjos Martins M, da Silva Meira C, et al. Asymptomatic cryptococcal antigen prevalence detected by lateral flow assay in hospitalised HIV-infected patients in São Paulo, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2016;21:1539–44, <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.12790>.