



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Epidemiología actual y diagnóstico de laboratorio de las micosis endémicas en España

María J. Buitrago y Manuel Cuenca-Estrella*

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 10 de agosto de 2011
Aceptado el 26 de septiembre de 2011
On-line el 29 de noviembre de 2011

Palabras clave:

Micosis primarias
PCR en tiempo real
Bioseguridad

Keywords:

Primary mycoses
Real time PCR
Biosafety

R E S U M E N

La histoplasmosis y la paracoccidioidomicosis están aumentando en España asociadas a la inmigración y los viajes a regiones endémicas. En las últimas tres décadas se han comunicado 128 casos de histoplasmosis en España, 59 en viajeros, 63 en inmigrantes, tres autóctonos por consumo de drogas contaminadas, dos por contagio en el laboratorio y uno en un receptor de trasplante de órgano sólido. El primer caso de paracoccidioidomicosis publicado data del año 1969, desde entonces se han publicado 21 casos en nuestro país. Estos casos evolucionaron de forma crónica tras largos periodos de latencia, que fueron de hasta 50 años. No se ha detectado un aumento similar en la frecuencia de otras micosis consideradas endémicas como la blastomicosis, la coccidioidomicosis, la lobomicosis, la pitiosis o la esporotricosis. Los hongos endémicos deben ser manipulados en instalaciones que cumplan los requisitos de bioseguridad para patógenos del grupo 3, lo que debería ser considerado en todos los cultivos realizados con muestras procedentes de enfermos con cuadros clínicos compatibles.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycoses in Spain

A B S T R A C T

Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis are emerging infections in Spain associated with immigration and travelling. In last three decades a total of 128 cases of histoplasmosis have been reported in Spain, 59 in travellers, 63 in immigrants, three associated to drug abuse, two in laboratory workers, and one in a solid organ transplant receptor. In 1969 the first Spanish case of paracoccidioidomycosis was published and a total of 21 cases have been reported so far. Those patients suffered from the chronic form of the disease with period of latency as long as 50 years. Other endemic mycoses such as blastomycosis, coccidioidomycosis, lobomycosis, pythiosis and sporotrichosis have not increased in frequency. Microbiological cultures of endemic fungi must be handled in facilities which comply with international biosafety regulations and must also be taken into account for cultures from patients with suspected endemic mycosis.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La frecuencia de las micosis endémicas ha aumentado en España en las últimas décadas. Este incremento se ha asociado a algunos cambios que se han producido en la sociedad española. En primer lugar, se ha observado un aumento de la población inmigrante procedente de regiones endémicas. Según el censo de 2010 (www.ine.es), el porcentaje de inmigrantes ascendía al 12,2% de la población, con un tercio procedente de países sudamericanos y un 16% de países africanos donde las micosis endémicas son frecuen-

tes. Por otro lado, los desplazamientos turísticos y profesionales de los españoles al extranjero se incrementan cada año, en concreto en el año 2009 fueron 12,8 millones los viajes realizados fuera de nuestras fronteras (www.iet.tourspain.es), de los que un 40% fueron realizados a zonas con micosis endémicas.

La micosis endémica que se describe con mayor frecuencia en nuestro país es la histoplasmosis, producida por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*¹. La infección se adquiere por inhalación de las conidias presentes en suelos ricos en materia orgánica, preferentemente guano de murciélagos o de pájaros². Aunque este hongo tiene una distribución cosmopolita, se encuentra sobre todo en el continente americano (*H. capsulatum* var. *capsulatum*), en los valles de los ríos Mississippi y Ohio, en América Central y del Sur y en el continente africano donde la variedad *capsulatum* convive con la

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mcuenca-estrella@isciii.es (M. Cuenca-Estrella).

variedad *duboisii*^{3,4}. La infección está asociada a actividades ocupacionales que impliquen remover el suelo, visitar cuevas donde existan murciélagos y, en general, realizar actividades al aire libre. Este hongo causa desde infecciones asintomáticas a infecciones pulmonares graves agudas y crónicas (<5%), aunque en enfermos inmunodeprimidos, especialmente en enfermos VIH+, origina micosis diseminadas de mal pronóstico.

También ha aumentado en España la frecuencia de la paracoccidioidomycosis (PCM), infección causada por *Paracoccidioides brasiliensis*⁵, hongo dimórfico cuyo hábitat natural está asociado a regiones húmedas de bosques tropicales o subtropicales⁶. La enfermedad se adquiere por inhalación de unas estructuras fúngicas en forma de propágulos⁷. La PCM es la micosis sistémica más frecuente de América tropical, endémica desde México hasta Argentina siendo Brasil el país donde se presentan el 80% de los casos⁸. Esta micosis se caracteriza por largos periodos de latencia hasta que la enfermedad se desarrolla. Respecto a las formas clínicas, existe una forma juvenil aguda con afectación sistémica y una forma crónica del adulto con manifestaciones pulmonares y lesiones extra-pulmonares especialmente en piel y mucosas. Esta enfermedad es mucho más frecuente en hombres debido a que los estrógenos inhiben la transición de fase micelial a la fase levaduriforme, que es la forma patógena del microorganismo⁹.

Debe indicarse que no se ha detectado un aumento similar en la frecuencia en nuestro país de otras micosis consideradas endémicas como la blastomycosis, la coccidioidomycosis, la lobomycosis, la pitiosis o la esporotricosis.

H. capsulatum y *P. brasiliensis* son patógenos primarios, lo que implica que pueden causar infección en personas inmunocompetentes, por lo que deben ser manipulados en laboratorios con instalaciones adecuadas para el manejo de patógenos pertenecientes al grupo 3, según la clasificación de niveles de bioseguridad¹⁰. La exposición accidental puede poner en riesgo la vida del trabajador. En los últimos años, se han descrito en nuestro país dos casos de histoplasmosis adquiridas en el laboratorio, uno de ellos debido a la manipulación de la fase micelial en instalaciones que no cumplían los requisitos legales para el manejo de estos hongos¹¹ y el otro originado por una inoculación accidental¹².

Este texto pretende analizar la epidemiología de estas micosis en España en los últimos años, ofreciendo al lector además una revisión sobre los métodos diagnósticos disponibles y sobre el manejo de estas especies en el laboratorio.

Epidemiología

Histoplasmosis

La mayor parte de los casos de histoplasmosis en España se observan en viajeros y en inmigrantes, con antecedentes de estancias en regiones endémicas^{8,13}. Desde finales de la década de los años 80 del siglo XX, se han descrito un total de 128 casos en nuestro país, 59 en viajeros, 63 en inmigrantes, tres autóctonos por consumo de drogas contaminadas, dos por contagio en el laboratorio y uno en un receptor de trasplante de órgano sólido (tabla 1). De estos 128 casos, 113 (88,3%) se han comunicado desde el año 2000, y 4 (3%) fueron causados por la variedad africana del hongo (var. *duboisii*). Respecto al cuadro clínico, 60 (46,9%) fueron infecciones pulmonares y 64 (50%) histoplasmosis diseminadas progresivas.

Las primeras publicaciones de histoplasmosis en viajeros que aparecen en España datan del año 2000¹⁴, aunque en ellas se revisan casos de los años 90¹⁵⁻¹⁷. Desde entonces y hasta hoy se han descrito 59 casos de histoplasmosis en viajeros, la mayoría de ellos procedentes del continente americano, en concreto de América Central y del Sur (58/59, 98%) (tabla 1).

Un estudio realizado en 2005 incluyendo 342 personas que habían realizado un primer viaje a Latinoamérica observó que el 20% de los viajeros tenían una intradermorreacción con histoplasmina positiva, lo que indicaba que una quinta parte de la población podía haber inhalado conidias de *Histoplasma* durante su viaje¹⁸. La probabilidad de positividad de la reacción cutánea era mayor en los viajes a Centroamérica y, como era de esperar, en estancias de larga duración o cuando se realizaron actividades en la naturaleza.

La mayor parte de estos viajeros no mostraban síntomas de infección y solo 13 casos fueron diagnosticados de histoplasmosis. En seis pacientes se pautó tratamiento con itraconazol. La sintomatología fue inespecífica con malestar, fiebre, tos y, en ocasiones, infiltrados pulmonares. Solo la fiebre ($p=0,002$) y la tos ($p=0,009$) se asociaron significativamente con la histoplasmosis. Por tanto, es una infección difícil de diagnosticar en su fase aguda si no se valora el antecedente del viaje a una zona endémica.

Debe indicarse que también se han descrito pequeños brotes^{14,18-23} en viajeros procedentes de distintos países de América Central y del Sur expuestos a una fuente común de infección (Ecuador, República Dominicana y Guatemala). Asimismo, existen descripciones de casos aislados en viajeros procedentes de Latinoamérica¹⁹. En la mayoría de las ocasiones los pacientes habían realizado actividades en la naturaleza consideradas de riesgo como visita de cuevas, excavaciones, obras de reconstrucción, estancia en zonas rurales y colaboración en tareas agrícolas. Esto pone de manifiesto que la inhalación de conidias puede darse en diferentes lugares y no solo visitando cuevas con guano, hecho que debe ser considerado en las consultas especializadas de medicina del viajero.

Otro aspecto a revisar son las manifestaciones crónicas de la infección. Una de las características de la histoplasmosis es que pueden aparecer signos de la infección años después del contacto, incluso en enfermos que tuvieron infecciones agudas asintomáticas. En ocasiones, quedan como secuela de las infecciones pulmonares nódulos fibrosos que van calcificándose y formando bronquiolitos. En algunos enfermos, como consecuencia de una respuesta inmune excesiva, se pueden producir complicaciones fibrosantes como mediastinitis granulomatosa y pericarditis. En pacientes con enfermedades pulmonares crónicas se han observado cavidades, fibrosis e histoplasmosomas^{14,24,25}. Incluso se han descrito reactivaciones de la infección²⁶. Las manifestaciones crónicas de la histoplasmosis son aún más difíciles de detectar que las infecciones agudas. Actualmente no son frecuentes, pero debe señalarse que es muy probable que aumenten en el futuro debido a la gran cantidad de personas que pueden haber sufrido una infección asintomática tras viajar por zonas endémicas en los últimos años.

Como se indicó anteriormente, el otro grupo de riesgo de la histoplasmosis en España son los inmigrantes. A diferencia de los viajeros, la histoplasmosis en inmigrantes se observa en personas con alguna clase de inmunodepresión, mayoritariamente en pacientes con VIH^{8,13,27-39}, aunque también se han descrito casos con otras enfermedades de base, como tratamientos con corticoides por dermatomiositis³⁰, cáncer y cuadros hematológicos^{8,27}. En estos pacientes suele observarse una histoplasmosis diseminada progresiva cuyo origen puede ser una reactivación endógena del hongo al desarrollarse la inmunodepresión en pacientes que tenían una infección crónica o latente, aunque también se han descrito reinfecciones. Los síntomas son fiebre, pérdida de peso, astenia, tos, disnea, infiltrados pulmonares, adenopatías, lesiones cutáneas y hepato-esplenomegalia. Hay casos de afectación neurológica, digestiva y laríngea. La mortalidad sin tratamiento es muy elevada^{8,40}. Es fácil confundir esta enfermedad con una tuberculosis diseminada, con sarcoidosis o con otras afecciones del sistema mononuclear fagocítico. Además, en un 15% de los casos

Tabla 1

Casos de histoplasmosis en España según las publicaciones revisadas. La tabla incluye tipo de paciente, técnicas diagnósticas utilizadas y la presentación clínica

Autor, año publicación (referencia)	N.º casos descritos	Tipo de paciente	Técnica diagnóstica empleada	N.º de casos con cada presentación clínica		
				Histoplasmosis pulmonar aguda	Histoplasmosis diseminada progresiva	Histoplasmosis crónica/otras
Buitrago et al., 2011 ¹²	1	Accidente de laboratorio	Cultivo y técnicas moleculares	-	-	1 ^a
Rodríguez et al., 2011 ³⁰	4	Inmigrantes	Cultivo y técnicas moleculares	-	4	-
Buitrago et al., 2011 ⁸	33 ^b	Viajeros/inmigrantes	Cultivo, serología y técnicas moleculares	6	27 ^c	-
Norman et al., 2009 ¹³	10	Viajeros/inmigrantes	Cultivo, serología y examen microscópico	5	5	-
Torres-Rodríguez et al., 2009 ²⁶	1	Viajero larga estancia	Examen microscópico e intradermorreacción	-	-	1
Gomez et al., 2009 ³⁸	1	Inmigrante	Cultivo y examen microscópico	-	-	1
Campoamor et al., 2008 ³⁵	1	Inmigrante	Examen microscópico	-	1	-
García-Marrón et al., 2008 ²⁵	1	Viajero larga estancia	Cultivo	-	-	1
Gil-Brusola et al., 2007 ²⁸	1	Inmigrante	Cultivo, técnicas moleculares y examen microscópico	-	1	-
Alonso et al., 2007 ¹⁹	4	Viajeros	Técnicas moleculares e intradermorreacción	4	-	-
Ferreres et al., 2007 ³⁷	1	Inmigrante	Cultivo y examen microscópico	-	1	-
López-Perezagua et al., 2007 ³⁹	1	Inmigrante	Cultivo y examen microscópico	-	1	-
Tutor-Ureta et al., 2006 ³¹	1	Inmigrante	Cultivo	-	1	-
García-Vázquez et al., 2005 ²⁰	9	Viajeros	Intradermorreacción	9	-	-
Ara et al., 2005 ⁴⁹	1	Trasplante de órgano sólido	Cultivo	-	1	-
Gascón et al., 2005 ¹⁸	13	Viajeros	Intradermorreacción	13	-	-
De José et al., 2005 ²⁷	2	Inmigrantes	Cultivo y examen microscópico	-	2	-
Cosme et al., 2005 ³⁶	1	Inmigrante	Examen microscópico	-	1	-
Terranclède de Juan et al., 2004 ⁴⁶	2	Viajero y transmisión parenteral	Cultivo y examen microscópico	-	2	-
Flor et al., 2003 ²²	1	Viajero	Cultivo e intradermorreacción	1	-	-
Molina et al., 2002 ²⁹	3	Viajeros/Inmigrantes	Cultivo e intradermorreacción	1	2 ^d	-
Abella et al., 2002 ³²	1	Inmigrante	Cultivo	-	1	-
Gascón et al., 2000 ²¹	7	Viajeros	Serología e intradermorreacción	7	-	-
Olalla et al., 2001 ²³	1	Viajero	Serología e intradermorreacción	1	-	-
Torres-Rodríguez et al., 2000 ¹⁴	12	Viajeros	Serología e intradermorreacción	12	-	-
Benito et al., 1998 ⁴⁷	2	Inmigrante y viajero larga estancia	Cultivo y examen microscópico	-	2	-
Santos et al., 1997 ⁴⁵	1	Posible inhalación de conidias	Cultivo y examen microscópico	-	1	-
Bayés et al., 1996 ³⁴	4	Inmigrantes y viajeros larga estancia	Cultivo y examen microscópico	-	4	-
Rubio et al., 1996 ¹⁷	1	Viajero larga estancia	Cultivo y serología	-	1	-
Gallardo et al., 1995 ¹⁶	1	Larga Estancia	Cultivo y examen microscópico	-	1	-
Cuadros et al., 1994 ¹⁵	1	Larga Estancia	Cultivo	-	1	-
Alados et al., 1993 ⁴⁴	1	Transmisión parenteral	Cultivo	-	1	-
Añón et al., 1993 ³³	1	Inmigrante	Cultivo	-	1	-
Yravedra et al., 1989 ¹¹	1	Accidente de laboratorio	Cultivo	1	-	-
Puente et al., 1989 ⁴³	1	Inmigrante	Cultivo y examen microscópico	-	1	-
Díaz et al., 1988 ⁴²	1	Inmigrante	Cultivo	-	1	-

^aEl paciente sufrió histoplasmosis primaria cutánea. ^bNo se incluyen los casos publicados en trabajos previos recogidos en la tabla. ^cSe incluyen tres casos con histoplasmosis africana. ^dSe incluye un caso con histoplasmosis africana.

de histoplasmosis en pacientes VIH positivos, se ha observado la co-infección por tuberculosis⁴¹. Según las recomendaciones^{24,28}, la histoplasmosis diseminada debe ser tenida en cuenta en el diagnóstico diferencial en pacientes con sida con recuentos de linfocitos CD4+ por debajo de 150 células/ μ l, con fiebre prolongada que hayan viajado o residido en área endémica o que sean consumidores de drogas por vía parenteral.

En inmigrantes de origen subsahariano puede darse la histoplasmosis africana, micosis producida por la variedad *duboisii*, que cursa de forma diferente. Aparecen lesiones osteolíticas en costillas, vértebras y huesos largos, así como nódulos subcutáneos y úlceras cutáneas. No suele existir afectación pulmonar.

Respecto a los datos epidemiológicos sobre la histoplasmosis en inmigrantes en nuestro país, las primeras publicaciones aparecen a

finales de los años 80 y se trata de pacientes con sida^{42,43}, en total se han descrito 63 casos. A estos, hay que añadir 3 casos con una clínica similar a la del inmigrante, histoplasmosis diseminada progresiva, en pacientes que no tenían antecedentes de viajes pero eran HIV+ consumidores de drogas y se contagiaron por vía parenteral al compartir jeringuillas con personas infectadas con *Histoplasma* o por inhalación (tabla 1)^{44–46}.

Benito et al. realizaron la primera revisión de casos entre los años 1988 y 1998, describiendo 13 casos, todos ellos con sida como enfermedad de base, posteriormente Gil-Brusola et al. revisaron los casos de histoplasmosis diseminada en pacientes con sida publicados desde el año 1988 hasta el 2004. En total describieron 23 casos, la mayoría hombres (91%), todos ellos menores de 50 años. La mayor parte de los casos eran inmigrantes sudamericanos con las características descritas en los párrafos precedentes^{28,47,48}.

Buitrago et al.⁸ describieron 39 casos de histoplasmosis importada, de los cuales 30 eran inmigrantes, todos ellos inmunodeprimidos, la mayoría de ellos con sida (97%) con una histoplasmosis diseminada progresiva. La edad media de los pacientes fue de 34 años y el porcentaje de hombres y mujeres fue similar. La mayoría de los pacientes procedía de Sudamérica, pero también describen un 14% de pacientes procedentes de países africanos y en tres casos los autores pudieron verificar que la cepa causante de la infección pertenecía a la especie *H. capsulatum* var. *duboisii*, los tres eran pacientes con sida y presentaban una histoplasmosis diseminada.

Por último, como se indicó previamente, existe un caso en la literatura de un receptor de trasplante de órgano sólido aunque no existían antecedentes epidemiológicos en el donante ni en el receptor⁴⁹ así como dos casos de histoplasmosis adquirida en el laboratorio^{11,12}.

Paracoccidioidomicosis

La PCM en España es una enfermedad menos frecuente que la histoplasmosis pero cuya presencia también ha aumentado en los últimos años. Los casos publicados en España corresponden a inmigrantes procedentes de regiones endémicas o personas que han vivido largos periodos en dichas regiones^{8,50–59}. El primer caso publicado data del año 1969⁶⁰, desde entonces se han publicado 21 casos en nuestro país (tabla 2). Estos casos tuvieron un curso crónico tras largos periodos de latencia, que fueron de hasta 50 años⁵¹, lo que complicó su diagnóstico. Se caracteriza por un síndrome constitucional, tos, disnea progresiva y lesiones en la mucosa oral y la laringe. Pueden aparecer infiltrados intersticiales pulmonares bilaterales. En pacientes con sida, la reactivación de un foco latente puede producir una infección diseminada, parecida a la

forma aguda de PCM. Casi todos los casos publicados corresponden a hombres y en gran parte de ellos el diagnóstico inicial fue erróneo^{8,50}.

Es fácil confundir la PCM con tuberculosis, sarcoidosis o carcinoma de células escamosas⁵¹. Se ha descrito un caso fatal de esta micosis en un inmigrante que fue tratado con corticoides sistémicos al ser diagnosticado erróneamente de sarcoidosis⁶¹. No se han descrito brotes de esta enfermedad⁶². Por último, se ha comunicado un caso de PCM cutánea primaria producida por un corte accidental con una cuchilla de barbero en un paciente que había vivido en Venezuela⁶³.

Dado que el porcentaje de inmigrantes en España procedente de Sudamérica es elevado es bastante probable que muchos casos no se estén detectando o se confundan con otros procesos. Por tanto, es esencial realizar una buena anamnesis y hay que considerar la PCM en personas procedentes de áreas endémicas o con larga estancia en esas áreas con lesiones mucocutáneas o infiltrados pulmonares bilaterales aunque haya pasado mucho tiempo desde que salieron de la región endémica.

Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de ambas micosis es difícil fuera de las regiones endémicas. El método de referencia sigue siendo el cultivo, aunque estos hongos son de crecimiento lento y se requieren instalaciones con nivel de bioseguridad para microorganismos del grupo 3.

Histoplasmosis

Los cultivos son negativos en la mayoría de los casos de histoplasmosis asintomática o leve⁶⁴, como es la que aparece en viajeros. En estos enfermos la histoplasmina y las pruebas serológicas pueden ser de utilidad en el diagnóstico retrospectivo de la infección. En casos pulmonares graves, con antecedentes epidemiológicos compatibles, la visión de levaduras en muestras respiratorias debería ser considerada como una histoplasmosis probable⁶⁵. El cultivo e identificación del hongo constituye el diagnóstico de certeza. En infecciones pulmonares graves, la sensibilidad del hemocultivo es variable.

En el caso de infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos, el examen microscópico de líquidos orgánicos estériles y de tejidos ayuda al diagnóstico, aunque se ha descrito hasta un 50% de falsos negativos en los exámenes histopatológicos^{41,66}. Los hemocultivos son positivos en un porcentaje elevado de casos de histoplasmosis diseminada progresiva especialmente mediante el uso de sistemas de lisis-centrifugación⁴⁰. La serología es positiva en un 50% de los pacientes y solo indica contacto previo con el

Tabla 2
Casos de paracoccidioidomicosis en España según las publicaciones revisadas. La tabla incluye tipo de paciente y técnicas diagnósticas utilizadas. Todos los casos descritos en España han sido infecciones crónicas del adulto

Autor/Año publicación/Referencia	N.º casos descritos	Tipo de paciente	Técnica diagnóstica empleada
Buitrago et al., 2011 ⁸	5 ^a	Inmigrantes y viajeros larga estancia	Cultivo, serología y técnicas moleculares
Mayayo et al., 2007 ⁵²	1	Inmigrante	Examen microscópico
Botas-Velasco et al., 2006 ⁵⁰	1	Inmigrante	Serología y examen microscópico
Lopez-Castro et al., 2005 ⁶¹	1	Viajero larga estancia	Examen microscópico
Ginarte et al., 2003 ⁵¹	3	Viajero larga estancia	Cultivo y examen microscópico
García-Bustinduy et al., 2000 ⁶³	1	Viajero larga estancia	Cultivo, serología y examen microscópico
García et al., 1997 ⁵⁴	1	Sin datos	Sin datos
Pereiro et al., 1996 ⁵⁸	1	Sin datos	Sin datos
Migueluez et al., 1995 ⁵⁵	2	Viajero larga estancia	Examen microscópico
Pereiro y Petreiro, 1987 ⁵⁷	1	Sin datos	Sin datos
Pereiro, 1974 ⁵⁶	2	Viajero larga estancia	Cultivo y examen microscópico
Simon et al., 1970 ⁵⁹	1	Sin datos	Sin datos
Vivancos et al., 1969 ⁶⁰	1	Sin datos	Sin datos

^aNo se incluyen los casos publicados en trabajos previos recogidos en la tabla.

hongo, lo que es habitual en inmigrantes procedentes de zonas endémicas^{24,67,68}.

La baja rentabilidad de la microscopía y de los cultivos ha hecho que se desarrollen técnicas alternativas al cultivo. La detección de anticuerpos por inmunodifusión o fijación de complemento tienen utilidad. Los anticuerpos aparecen entre la segunda y la sexta semana de infección y como se ha indicado, no suelen servir para detectar la infección aguda aunque sí pueden ayudar a diagnosticar las complicaciones crónicas y la meningitis^{24,67,68}.

La detección de un polisacárido de *H. capsulatum* en suero, lavado broncoalveolar y orina se ha convertido en una técnica alternativa al cultivo de gran utilidad diagnóstica, pero que no se encuentra disponible fuera de zonas endémicas y no se ha comercializado⁶⁹⁻⁷². En enfermos VIH+ con infección diseminada, la sensibilidad es más elevada en orina y lavados broncoalveolares (80-90%) que en suero (50-80%). En pacientes no VIH, la antigenuria y la antigenemia son menos intensas, por lo que se recomienda la detección del antígeno en secreciones respiratorias ya que tiene una sensibilidad del 90% en infecciones pulmonares⁷³.

En las recomendaciones diagnósticas de la infección fúngica de la SEIMC²⁴, se considera que la detección de antígeno es una técnica útil, pero que su falta de disponibilidad fuera de los EE.UU. es una limitación insalvable. Por ello, se han desarrollado técnicas diagnósticas basadas en la PCR. Se han empleado en varias decenas de enfermos y parecen ser muy útiles en pacientes VIH+ con infección diseminada y en viajeros con infecciones respiratorias graves. Son métodos con una sensibilidad excepcional en muestras respiratorias y en biopsias (>90%), y con menos fiabilidad en sangre y suero. No existen técnicas comercializadas, aunque se encuentran disponibles en centros de referencia^{8,67,68,74-76}.

Del total de 123 casos descritos en España, la histoplasmosis fue diagnosticada mediante cultivo en 49 casos (40%), aunque en dos de estos casos el hongo se aisló a partir de una necropsia^{27,30}. La mayoría de los casos en los que se aisló el microorganismo correspondían a pacientes con histoplasmosis diseminada. Las técnicas serológicas como la inmunodifusión o la fijación del complemento se realizaron en 66 casos (54%). La reacción intradérmica de la histoplasmina se empleó en total en 46 pacientes (37%), todos ellos viajeros y el diagnóstico se basó solamente en esta técnica en 22 casos. La observación directa y las pruebas histopatológicas sirvieron para el diagnóstico en 24 casos (19%) y, por último, las técnicas moleculares se emplearon en 41 casos (33%). En algunas ocasiones se emplearon varias técnicas diagnósticas para detectar la infección (tabla 1). En estos casos en los que se pudieron realizar comparaciones sobre la rentabilidad de las técnicas diagnósticas (45 pacientes), el cultivo presentó una sensibilidad del 70%, la serología del 40% y las técnicas basadas en la PCR en tiempo real del 85%⁸.

Paracoccidioidomycosis

En el caso de las infecciones por *P. brasiliensis*, el examen microscópico y el cultivo son también las técnicas de referencia, aunque su rentabilidad sea discreta. Las lesiones cutáneas y mucosas que suelen darse en la PCM facilita la toma de muestras. El diagnóstico presuntivo se realiza por visión directa de las levaduras en un caso compatible. Estas levaduras son esféricas u ovaladas, con pared doble y protuberancias, que le dan aspecto de timón de barco. La confirmación se realiza mediante el cultivo del hongo.

También se han desarrollado técnicas alternativas al cultivo para el diagnóstico de esta micosis. Existen pruebas de detección de anticuerpos, que muestran una gran sensibilidad en enfermos inmunocompetentes, con títulos más elevados en aquellos pacientes que tienen la forma grave de la enfermedad. La seroconversión se produce varias semanas después del contacto y los títulos son detectables hasta dos años después. Por tanto, la serología no es útil en el diagnóstico de la infección en enfermos

inmunodeprimidos y en pacientes con la forma crónica de la infección, que son los casos más frecuentes en España²⁴.

Para estos casos se han diseñado técnicas de detección antigénica. La detección del antígeno circulante gp43 es una técnica desarrollada en Brasil y que se usa en laboratorios de este país para el diagnóstico de la infección^{77,78}. Se ha evaluado en muestras sanguíneas demostrando una gran sensibilidad diagnóstica. También muestra una buena fiabilidad en LCR y muestras respiratorias, así como para realizar el seguimiento de la infección.

Existen también técnicas de detección de ácidos nucleicos que han demostrado su utilidad diagnóstica. Poseen una elevada sensibilidad y especificidad, especialmente en muestras respiratorias y biopsias. Son más rápidas que el cultivo y evitan la manipulación de los cultivos. También se ha demostrado que sirven para la monitorización de la carga fúngica una vez iniciado el tratamiento^{8,79}.

Respecto a las técnicas diagnósticas que sirvieron para el diagnóstico en los casos descritos en España, el cultivo fue positivo en siete casos de los 18 que se tienen datos. En doce casos (57,1%) se emplearon técnicas de observación directa y de histopatología. En ocho casos se emplearon técnicas serológicas de inmunodifusión. Las técnicas moleculares basadas en la PCR en tiempo real se emplearon en seis casos (28,6%), todos ellos publicados recientemente^{8,79}.

Manipulación de muestras clínicas y cultivos. envío de muestras

Como ya se ha indicado, la manipulación de los cultivos de estos hongos debe realizarse en un laboratorio con instalaciones para el manejo de patógenos pertenecientes al grupo 3 de bioseguridad. Ambos hongos dimórficos, lo que significa que en el ambiente se encuentran en su forma micelial y en el enfermo en forma de levadura. La forma micelial es la que puede ser inhalada y supone un riesgo para el personal del laboratorio⁸⁰. Los enfermos y las muestras clínicas, que tienen el hongo en su forma levaduriforme, no necesitan ser tratados con precauciones especiales y no se recomienda el aislamiento de los enfermos.

En los años 80 ya se publicó un caso en España de histoplasmosis adquirida en el laboratorio al trabajar con los cultivos fuera de la cabina de bioseguridad¹¹. Por tanto, ante el actual incremento de casos de histoplasmosis en España, se deben extremar las precauciones en todos los cultivos realizados con muestras procedentes de enfermos con cuadros clínicos compatibles. La sospecha clínica y el antecedente epidemiológico son fundamentales, por lo que es necesario que el personal del laboratorio reciba esa información para que los cultivos sean manipulados en las instalaciones que les corresponde.

La visión de levaduras en muestras de enfermos con cuadros clínicos compatibles en un examen microscópico directo o en un estudio anatómo-patológico debe ser puesta en conocimiento del personal del laboratorio. No obstante, debe insistirse en que un examen microscópico negativo no descarta la infección.

Para la siembra se recomiendan tubos de plástico con tapón de rosca y, si esto no es posible, las placas deben estar dentro de cajas o bolsas con cierre hermético. Si es necesario el concurso de un centro de referencia, las muestras clínicas con sospecha de micosis endémica no necesitan requisitos adicionales de bioseguridad ya que portan la forma levaduriforme, pero los cultivos sí que deben ser enviados en paquetes especiales y con medidas de contención según las recomendaciones de la OMS y el artículo 21 del Convenio Postal Universal (B.O.E. n.º 303 de 27 de diciembre de 1966)^{81,82}. Es obligatorio que todo el que manipule el paquete esté informado sobre el riesgo que conlleva el cultivo.

Se ha descrito recientemente un caso de histoplasmosis cutánea primaria adquirida en el laboratorio¹². La infección se produjo por

una inoculación accidental en un dedo con una aguja que contenía material de una adenopatía procedente de un paciente con histoplasmosis diseminada. El tratamiento inicial con itraconazol no fue eficaz y fue necesario realizar un drenaje quirúrgico para limpiar la lesión. Este caso, aunque poco frecuente, pone de manifiesto la necesidad de extremar la atención por parte del personal sanitario en la toma de muestras, en su envío y en el manejo de cultivos. Las recomendaciones internacionales y nacionales⁸² aconsejan que se elaboren procedimientos de laboratorio con protocolos específicos para el manejo de estos microorganismos y con planes de actuación en el caso de que se produzca un accidente en el laboratorio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Darling ST. A protozoal general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necrosis in the liver, spleen, and lymph nodes. *JAMA*. 1906;46:1283–5.
- Emmons CW. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Monogr*. 1956;39:237–9.
- Kauffman CA. Histoplasmosis. *Clin Chest Med*. 2009;30:217–25.
- Loulergue P, Bastides F, Baudouin V, Chandenier J, Mariani-Kurkdjian P, Dupont B, et al. Literature review and case histories of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* infections in HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1647–52.
- Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. *An Fac Med Univ Sao Paulo*. 1930:5125–41.
- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001;39:233–41.
- Wanke B, Aide MA. Chapter 6—paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol*. 2009;35:1245–9.
- Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. *J Travel Med*. 2011;18:26–33.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1984;46:346–53.
- Schell WA. *Mycotic Agents of Human Disease*. En: Fleming DO, Hunt D, editores. *Biological Safety*. Washington: ASM Press; 2006. p. 163–78.
- Yravedra J, Robledo AG, Renedo G, Aguirre M. Un caso autóctono por inhalación de esporas en el laboratorio. *Rev Esp Microbiol Clin*. 1989;4:310–3.
- Buitrago MJ, Gonzalo-Jimenez N, Navarro M, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. A case of primary cutaneous histoplasmosis acquired in the laboratory. *Mycoses*. 2011;54:e859–61.
- Norman FF, Martin-Davila P, Fortun J, Drona F, Quereda C, Sanchez-Sousa A, et al. Imported histoplasmosis: two distinct profiles in travelers and immigrants. *J Travel Med*. 2009;16:258–62.
- Torres-Rodríguez JM, Ribas-Forcadell E, Gascon J, Lopez-Jodra O, Espasa M. Utilidad diagnóstica de la prueba intradérmica con histoplasmina, en áreas no endémicas de histoplasmosis. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17:97–101.
- Cuadros JA, Albarran F, Garcia-Rodríguez M, Gonzalez A, Romanyk J, Beltran M. Disseminated cutaneous lesions in a patient with bacteremia caused by *Mycobacterium avium*-M. intracellulare. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1994;12:313–5.
- Gallardo J, Casal M, Ferreres JC. Diagnosis of Histoplasmosis in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Acta Cytol*. 1995;39:595–6.
- Rubio A, Unzaga MJ, Baraia-Etxaburu J, Teira R, Rojo P, Cisterna R, et al. Disseminated histoplasmosis in a patient infected with the HIV. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1996;14:60–1.
- Gascón J, Torres JM, Jiménez M, Mejías T, Triviño F, Gobbi F, et al. Histoplasmosis infection in Spanish travelers to Latin America. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:839–41.
- Alonso D, Muñoz J, Letang E, Salvado E, Cuenca-Estrella M, Buitrago MJ, et al. Imported acute histoplasmosis with rheumatologic manifestations in Spanish travelers. *J Travel Med*. 2007;14:338–42.
- García-Vázquez E, Velasco M, Gascón J, Corachán M, Mejías T, Torres-Rodríguez M. Infección por *Histoplasma capsulatum* en un grupo de cooperantes en Guatemala. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:274–6.
- Gascón J, Torres JM, Luburich P, Ayuso JR, Xaubet A, Corachán M. Imported Histoplasmosis in Spain. *J Travel Med*. 2000;7:89–91.
- Flor A, Estivill D, Pérez R, Ordeig J, Ramos F, Soler-Bel J, et al. Histoplasmosis pulmonar aguda en un viajero español a Nicaragua: ejemplo de enfermedad importada. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:24–8.
- Olalla J, Ramon CJ, Rioperez E, Yubero B. [Acute pulmonary histoplasmosis after a journey to Peru]. *Med Clin (Barc)*. 2001;116:679.
- Ayats J, Martin-Mazuelos E, Peman J, Quindos G, Sanchez F, Garcia-Rodriguez J, et al. Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:15–39.
- García-Marrón M, García-García JM, Pajin-Collada M, Alvarez-Navascues F, Martínez-Muniz MA, Sanchez-Antuna AA. Chronic pulmonary histoplasmosis diagnosed in a nonimmunosuppressed patient 10 years after returning from an endemic area. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:567–70.
- Torres-Rodríguez JM, Segura-Roca G, Coll J. Histoplasmosis 45 years after infection in an immunocompetent man. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26:244–6.
- De José MI, Orio M, Bilbao A, García J, Baquero F. Histoplasmosis diseminada. *An Pediatr (Barc)*. 2005;63:249–52.
- Gil-Brusola A, Peman J, Santos M, Salavert M, Lacruz J, Gobernado M. Disseminated histoplasmosis with hemophagocytic syndrome in a patient with AIDS: description of one case and review of the Spanish literature. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:312–6.
- Molina L, Garau M, Garcia J, Odriozola M, Del Palacio A. Three cases of imported histoplasmosis in our hospital. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:204–7.
- Rodríguez I, Navascues A, Reparaz J, Salvo S, Gil-Setas A, Martínez-Penuela JM. Imported histoplasmosis in Navarra: Presentation of four cases. *Rev Iberoam Micol*. 2011.
- Tutor-Ureta P, Duran-Campo P, Linares M, Yebra-Bango M. Disseminated infection due to histoplasma in Spain as first manifestation of HIV infection. *Rev Clin Esp*. 2006;206:359–60.
- Abella ML, Layne P, Perera A, Diez O, Linares M, Míguez M, et al. Síndrome febril, poliadenopatías y hepatoesplenomegalia. *Rev Clin Esp*. 2002;202:617–8.
- Añón S, Blanes M, Evole M, Lopez-Aldeguer J. Histoplasmosis diseminada en paciente con Sida. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1993;11:343–4.
- Bayes B, Romeu J, Vaquero M, Ribera M, Navarro JT, Rosell A, et al. Disseminated histoplasmosis and AIDS. Report of 4 cases. *Med Clin (Barc)*. 1996;106:700–3.
- Campoamor MT, Galiana D, De la Fuente B, Arias I. Histoplasmosis diseminada en paciente con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc)*. 2008;131:240.
- Cosme A, Pardo E, Felipe F, Iribarren JA. Abdominal pain in a HIV-infected patient. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005;97:196–210.
- Ferreres JR, Jucglá A, Moreno A, Peyrí J. Histoplasmosis clásica diseminada con afectación cutánea. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98:372–6.
- Gomez E, Crespo V, Sanz A. Un varón transexual procedente de Paraguay infectado por VIH y preocupado por... *Mas Dermatol*. 2009;7:14–6.
- Lopez-Perezagua MM, Martinez-Peinado C, Arjona-Zaragoza FJ, Pasquau-Liano F. Cervical lymphadenitis, pancytopenia and fever in a patient with HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:157–8.
- Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:115–32.
- Gutiérrez ME, Canton A, Sosa N, Puga E, Talavera L. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1199–202.
- Diaz JL, García JL, Villasante C, Villamor J. Histoplasmosis diseminada en un paciente afecto de síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Med Clin (Barc)*. 1988;90:40.
- Puente A, Laguna A, Jauregui C, Martínez P. Acquired immunodeficiency syndrome and disseminated histoplasmosis. *J Infect*. 1989;18:101–2.
- Alados JC, Miranda C, Ortiz F, Cano R. Disseminated histoplasmosis in an AIDS patient in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12:793–4.
- Santos J, Arana C, Rivero A, García-Bravender R. Histoplasmosis and AIDS. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1997;15:229–30.
- Terrance de Juan I, Mateos Rodríguez F, Solera Santos J, Sánchez Hellín V. [Disseminated histoplasmosis in two brothers with AIDS]. *Rev Clin Esp*. 2004;204:381–3.
- Benito N, García VE, Blanco A, De Gorgolas M, Gadea I, Escalonilla P, et al. Disseminated histoplasmosis in AIDS patients. A study of 2 cases and review of the Spanish literature. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1998;16:316–21.
- Escalonilla P, Soriano ML, Grilli R, Fariña MC, Barat A, Martín L, et al. Histoplasmosis diseminada con afectación cutánea en paciente infectado por el VIH. *Actas Dermosifiliogr*. 1999;90:591–4.
- Ara J, Matas L, Lauzurica R, Agraz I, Bayes B, Bonet J, et al. Histoplasmosis en un trasplante renal. *Nefrología*. 2005;25:707–11.
- Botas-Velasco M, Jover-Díaz F, Ortiz de la Tabla-Ducasse V, Martínez-García C. Paracoccidioidomycosis importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:259–60.
- Ginarte M, Pereiro Jr M, Toribio J. Imported paracoccidioidomycosis in Spain. *Mycoses*. 2003;46:407–11.
- Mayayo E, Lopez-Aracil V, Fernandez-Torres B, Mayayo R, Dominguez M. Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:44–6.
- Ramirez-Olivencia G, Ramirez-Rubio O, Gonzalez PR, Herrero MD, Puente SP. Paracoccidioidomycosis in a Spanish missionary. *J Travel Med*. 2010;17:139–40.
- García A, Suarez M, Gandara J, Pereiro J, Pardo F, Diz P. Introduction of paracoccidioidomycosis into Spain by a galician returnee from Venezuela. *Med Oral*. 1997;2:39–43.
- Miguez M, Amerigo MJ, Perera A, Rosquete J. Imported paracoccidioidomycosis. Apropósito de 2 casos. *Med Clin (Barc)*. 1995;105:756.
- Pereiro M. Dos casos de blastomycosis sudamericana observados en España. *Actas Dermosifiliogr*. 1974;54:509–22.
- Pereiro M, Pereiro M. A propósito de un nuevo caso de paracoccidioidomycosis observado en España. *Rev Iberoam Micol*. 1987;4:149–57.

58. Pereiro Jr M, Pereiro M, García GA, Toribio J. Immunological features of chronic adult paracoccidioidomycosis: report of a case treated with fluconazole. *Acta Derm Venereol.* 1996;76:84–5.
59. Simon A, Escudero R, Lavin R. Un caso de blastomicosis sudamericana observada en España. *Med Cutanea.* 1970;5:631–6.
60. Vivancos G, Marrero B, Hernandez B, Padron G. La blastomicosis sudamericana en España. Primera observación en las islas Canarias. En: *VV.AA. Actas VII Congreso Hispano-Portugués de Dermatología Médico Quirúrgica*; 1969, Oct 22–25; Granada, España. Granada: Gráficas del Sur; 1973. p. 330–5.
61. Lopez-Castro J, Blanco JJ, Santos C, Calvo M. Infección por Paracoccidioides brasiliensis en un inmigrante venezolano. *Med Clin (Barc).* 2005;125:125–39.
62. Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia.* 2008;165:197–207.
63. García-Bustinduy M, Guimera FJ, Arevalo P, Castro C, Saez M, Dorta AS, et al. Cutaneous primary paracoccidioidomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2000;14:113–7.
64. Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis by Detection of Histoplasma-Capsulatum Antigen in Serum and Urine Specimens. *N Engl J Med.* 1986;314:83–8.
65. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1813–21.
66. Gutierrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat LJ. Detection of Histoplasma capsulatum antigen in Panamanian patients with disseminated histoplasmosis and AIDS. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:681–3.
67. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25:665–8.
68. Buitrago MJ, Gomez-Lopez A, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. [Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:16–22.
69. Hage CA, Davis TE, Fuller D, Egan L, Witt III JR, Wheat LJ, et al. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in bronchoalveolar fluid. *Chest.* 2009.
70. Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002;43:29–37.
71. Wheat LJ. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6:1207–21.
72. Wheat LJ. Approach to the diagnosis of the endemic mycoses. *Clin Chest Med.* 2009;30:379–89, viii.
73. Swartzentruber S, Rhodes L, Kurkjian K, Zahn M, Brandt ME, Connolly P, et al. Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1878–82.
74. Guiot HM, Bertran-Pasarell J, Tormos LM, Gonzalez-Keelan C, Procop GW, Fradera J, et al. Ileal perforation and reactive hemophagocytic syndrome in a patient with disseminated histoplasmosis: the role of the real-time polymerase chain reaction in the diagnosis and successful treatment with amphotericin B lipid complex. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57:429–33.
75. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, et al. Identification of Histoplasma capsulatum from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1295–8.
76. Simon S, Veron V, Boukhari R, Blanchet D, Aznar C. Detection of Histoplasma capsulatum DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66:268–73.
77. Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Queiroz-Telles F, Balthazar AB, Lopes JD, et al. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:1363–6.
78. Marques da Silva SH, Colombo AL, Blotta MH, Lopes JD, Queiroz-Telles F, Pires DC. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3675–80.
79. Buitrago MJ, Merino P, Puente S, Gomez-Lopez A, Arribi A, Zancoppe-Oliveira RM, et al. Utility of Real-time PCR for the detection of Paracoccidioides brasiliensis DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2009:1–4.
80. Pentella MA, Kostle PA, Desjardin L, Gilchrist MJR. Biosafety for Microorganism Transmitted Primarily by the Airborne Route. En: Fleming DO, Hunt DL, editores. *Biological Safety.* Washington, D.C: ASM Press; 2006. p. 209–20.
81. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. NTP628: Riesgo Biológico en el Transporte de muestras y materiales infecciosos. 2011 [consultado 16 Nov 2011]. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/601a700/ntp.628.pdf>
82. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra: 2005.