Los métodos de laboratorio en el diagnóstico de la coccidioidomicosis

Teodoro Carrada-Bravo

Laboratory methods in the diagnosis of coccidioidomycosis

Coccidioides immitis and *Coccidioides posadasii*, the two recognized causes of coccidioidomycosis, may be diagnosed by direct microscopy, culture, serologic and the skin-test with mycelial coccidioidin. Identification of spherules by direct examination of secretions after addition of KOH, is more rapid and may speed diagnosis. Histopathology of infected tissue demonstrates acute and chronic granulomatous inflammation and in the section stained with hematoxylin-eosine (HE) or Grocott metamine-silver (GMS). Isolation of *Coccidioides* spp. by culture is not difficult, the fungus grows well on most mycologic media after 5-7 days of incubation and the laboratory should maintain a biological safety level 2 or 3. Phenotypic identification to genus level may be achieved by visualization of arthroconidia in culture. Isolates may be confirmed as *Coccidioides* spp. by molecular probes, but separation of species is best achieved by specialized molecular techniques, available at the Reference Laboratory. Immune diffusion and enzyme-immune assays (EIA) are commonly used for detection of IgM and IgG antibodies in serum. Sequential complement fixations (CF) for IgG class of antibody are useful for the prognosis of coccidioidomycosis.

Key words: *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, coccidioidomycosis, diagnosis.

Palabras clave: *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, diagnóstico de laboratorio de la coccidioidomicosis.

Centro de Estudios en
Infectología Tropical Irapuato,
Guanajuato, México.

Recibido: 26 de mayo de 2013

Aceptado: 7 de abril de 2014

Correspondencia a:

Teodoro Carrada-Bravo

drccarradabravo@hotmail.com

Introducción

La coccidioidomicosis es una enfermedad micótica profunda producida por dos especies similares de hongos dimórficos denominados *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, endémica en zonas semiáridas del continente americano.

Aspectos clínicos y radiológicos

La incidencia real de la enfermedad se desconoce debido a que no es de reporte obligatorio. Más de 60% de las infecciones primarias son asintomáticas, 30% cursa con un cuadro respiratorio autolimitado, 5% presenta eritema nodoso pretibial y sólo alrededor de 1% tendrá lesiones diseminadas por la piel, los huesos y articulaciones, o el sistema nervioso central.

El cuadro clínico de la coccidioidomicosis aguda es inespecífico, indistinguible de otras enfermedades respiratorias^{1,2}. En el interrogatorio del enfermo, debe recogerse los antecedentes de viajes o la estancia en áreas endémicas³.

En el hemograma de los casos diseminados se ha descrito leucocitosis moderada con eosinofilia de hasta 25%, y la velocidad de eritrosedimentación está elevada⁴.

La imagen radiográfica pulmonar permite conocer el

tipo y extensión de las lesiones, pero para determinar la causa es necesario hacer uso de los recursos del laboratorio.

Métodos microbiológicos

Cuando el médico clínico considera la posibilidad de la coccidioidomicosis, el diagnóstico de laboratorio se confirma de tres maneras:

Identificar las esferas (EF, Figura 1) por examen microscópico directo del exudado, el pus aspirado de un absceso frío, la muestra obtenida por lavado bronquial o por endoscopia. Se procesa con la preparación al estado fresco, teñido con blanco de calcoflúor que se une con la quitina o celulosa de la pared celular. Se requiere de un microscopio con luz fluorescente y la sensibilidad es de aproximadamente 22%. El montaje directo con una gota de KOH al 10% es fácil de preparar pero tiene menor sensibilidad que el blanco de calcoflúor y requiere de un observador experimentado⁴.

El estudio histopatológico de las biopsias de piel, ganglio linfático extirpado, o pieza de autopsia, es otra buena opción⁵. Los cortes seriados se tiñen con hematoxilina-eosina (HE), método versátil y útil para observar la hiperplasia pseudo-epiteliomatosa y la presencia de granulomas piógenos, con o sin células gigantes de

Figura 1. Esferas diagnósticas del *Coccidioides* spp. **A)** Inmadura con pared celular gruesa y birrefringente, H y E 100x. **B)** Proceso de endopartición por tabicamiento. **C)** Esfera madura con abundantes endosporas que salen al exterior, H y E 400x.

Figura 2. *Coccidioides* spp. cultivo, diez días a 20°C. **A)** Colonia lanuda con superficie granular, medio Sabouraud-glucosado. **B)** Artrosporas nucleadas (N), intercaladas por "separadores vacíos". **C)** Artrosporas infectantes "en cadena". Azul de lactofenol x450. **D)** Identificación molecular de las dos especies (Umayá).

Langhans, macrófagos activados, linfocitos y plasmocitos, y ocasionalmente con eosinofilia tisular¹.

La tinción más útil para resaltar la presencia tisular del hongo es la metenamina-plata de Gomori-Grocott (GG), con la que el hongo se tiñe de negro sobre fondo verde⁵. El diagnóstico se establece por la observación de esferas de 10-100 µm de diámetro, que se dividen por endopartición formándose así las endosporas nucleadas de 2-5 µm; la pared celular de la esfera es gruesa, de 2 µm, y birefringente^{1,2,6}.

Coccidioides spp. puede ser aislado por cultivo a partir de varios tipos de muestras clínicas. En el Laboratorio de Micología del Área Metropolitana de Phoenix, Arizona, en un lapso de seis años se procesaron 55.788 muestras clínicas; de ellas, se logró el aislamiento en 8,3% de 10.372 muestras del tracto respiratorio, 2,6% de 267 muestras de médula ósea, 0,9% en 2.280 muestras de líquido cefalorraquídeo, 0,6% en 649 muestras de tracto urinario y 0,4% en 5.026 hemocultivos⁴. El hongo crece fácilmente en medios de cultivo no selectivos como el agar-dextrosa de Sabouraud, con o sin cicloheximida, agar papa-dextrosa, agar gelosa-sangre de cordero, agar chocolate, agar-infusión de cerebro-corazón y otros. Cuando la muestra clínica contiene microbiota mixta es preferible cultivarla en un medio selectivo^{1,2,4}. Las colonias jóvenes son membranosas y grises, suelen hacerse visibles entre 2 y 16 días (Figura 2). A los cinco días, en promedio, se vuelven aterciopeladas, granulosas pero de color variable (blanco, grisáceo-sucio, mate y otros), y a los 10 días se han formado ya las arthroconidias (AC) infectantes. A la observación microscópica, las hifas tubulares son delgadas, septadas, las ramas laterales se hacen más gruesas y con muchos más septos. Finalmente, se generan "en cadena" las AC con pared más densa y gruesa, alternando con "células vacías" muy delgadas, frágiles y sin núcleos (separadores). Las AC, en forma de barril, miden 2,5 a 4 x 3 a 6 µm, tienen de uno a cuatro núcleos y se liberan fácilmente por fragmentación del micelio. Cuando la colonia envejece y se hace lanuda, las hifas vegetativas se van transformando en AC numerosas, se dispersan por el aire y pueden fácilmente causar infecciones al personal de laboratorio si no se trabaja con las medidas adecuadas de bioseguridad.

Si se identifica *Coccidioides* spp, no se realiza de rutina estudio de susceptibilidad, porque no se ha demostrado la aparición de mutantes resistentes durante los tratamientos⁴. El método se usa más bien, en pocos laboratorios de investigación interesados en el desarrollo de nuevos medicamentos antimicóticos.

La identificación fenotípica de la AC, más la demostración de las esferas en el examen directo o la biopsia, o la titulación positiva de anticuerpos IgM específicos en una muestra del suero, permiten afirmar categóricamente el diagnóstico de coccidioidomicosis.

Cuando no se han completado estos requisitos, la cepa aislada deberá ser sometida al estudio genético-molecular con una sonda género-específica (ACCUPROBE, Gen-Probe). Por este medio, se identifican las dos especies de *Coccidioides*. No se recomienda intentar la transformación del AC en esferas *in vitro* en el medio sintético de Converse (procedimiento muy riesgoso), ni tampoco se utiliza actualmente la inoculación en los animales de laboratorio (procedimiento caro, demoroso y también de alto riesgo). Los médicos clínicos, no necesitan, en

Figura 3. Métodos serológicos. **A)** Se titula la IgM por ELISA o inmunodifusión, la IgG tardía se mide por FC. **B)** IMDF-cuantitativa, en el pozo del centro se coloca el antígeno y en los pozos periféricos el suero diluido, y se forma la banda de precipitación diagnóstica de la micosis.

general, la diferenciación de las dos especies, ambas generan cuadros clínico-patológicos semejantes para el hospedero^{1,2,6}.

En los laboratorios de referencia, puede realizarse la reacción de polimerasa en cadena (RPC) con partidores (*primers*) específicos, más la determinación detallada de la secuencia molecular, proceso de interés principal para los epidemiólogos y taxonomistas. De modo general, *Coccidioides immitis* se encuentra en California, E.U.A. y en el noroeste de México, mientras *Coccidioides posadasii* está presente en Arizona, México y en los países endémicos de Sudamérica (Argentina, Venezuela, Brasil y Colombia).

Métodos serológicos

La primoinfección pulmonar induce la síntesis de inmunoglobulinas que no tienen efecto protector contra el hongo, pero son indicadores valiosos para confirmar el diagnóstico y valorar el pronóstico. Se utiliza la medición de los títulos séricos de IgM (respuesta temprana) e IgG (respuesta tardía) para establecer el diagnóstico (Figura 3). La IgM (anticuerpos precipitantes o aglutininas) aparece en la primera semana (50%), hasta la tercera semana (92%) del inicio del cuadro. La IgG (fijadores del complemento - FC) aparece desde la segunda semana, hasta la semana 28 del inicio. La titulación de FC requiere mayor complejidad técnica, y se hace sólo en laboratorios con personal experimentado⁷.

Hoy en día, se usan tres métodos serológicos: el inmunoensayo (ELISA) con sensibilidad de 83% para titular IgM o IgG⁸. Cuando el resultado es negativo no se requieren nuevas pruebas, pero cuando es positivo sí se necesita confirmación, por inmunodifusión (IMDF) en placa de agar, método con una sensibilidad de 71%. Este método es práctico y económico, aunque se requiere

la incubación por cuatro días. La IMDF puede hacerse cuantitativa en progresión logarítmica de la muestra sérica, y con un suero-testigo como control (Figura 3B).

La FC tiene sensibilidad de 56%, pero desde 1956 ha sido el estándar-de-oro para medir el nivel de la respuesta IgG, principalmente en las formas diseminadas, y es el método de elección para diagnosticar la meningo-encefalitis. Se le usa poco en las infecciones agudas, tempranas o benignas⁹. La titulación FC de muestras seriadas permite seguir la evolución clínica. Cuando el enfermo tiene títulos altos 1:32 a 1:64 o más, y no bajan a pesar del tratamiento, el pronóstico es malo; sin embargo, los laboratorios clínicos usan antígenos de potencia y calidad variable y el procedimiento de titulación no está bien estandarizado; por ello, la interpretación debe hacerse con cautela y considerando siempre los hallazgos clínicos y radiológicos, más los datos aportados por la biopsia, el cultivo y la intradermo-reacción con coccidioidina micelial (IDC)¹⁰.

La IMDF cuantitativa debe solicitarse cuando el suero sea anti-complementario; existen casos con cultivo positivo y serología negativa (18%). De modo general, se ha documentado que cuando los títulos medidos de FC e IMDF decrecen, la actividad clínica de la enfermedad remite.

Prueba de intradermo-reacción con coccidioidina (IDC)

La IDC consiste en la inyección intradérmica de 0,1 ml de una dilución 1:100 de coccidioidina micelial estandarizada. La reacción de induración cutánea se mide a las 48 h, y se le considera positiva cuando el diámetro es 5 mm o más. Los enfermos con primoinfección dan la prueba (+) en la primera semana de enfermedad (87%) o

segunda semana del inicio (99%). Un resultado negativo puede ser debido a la aplicación muy temprana, o bien, es indicativo de diseminación inminente (anergia). La IDC se usa como herramienta principal de la investigación epidemiológica para delimitar las zonas geográficas hiperendémicas (la región semiárida del Desierto de Sonora, alrededor de Phoenix y Tucson, Arizona, E.U.A., y se continua hasta Hermosillo, Sonora en México), con 50% o más de reactores positivos. Cuando la reactividad poblacional es de 5% o menos, se califica como zona no endémica¹¹.

Medidas de seguridad

Coccidioides spp. es un hongo potencialmente letal y de manejo riesgoso para el laboratorio. Las AC forman aerosoles infectantes muy fácilmente; por ello, los cultivos deben ser manejados dentro de una campana de flujo laminar con presión negativa, con nivel de bioseguridad estricto 2 a 3. El hongo crece rápidamente en las placas de Petri con casi cualquier medio de cultivo y todas las cepas deben ser manipuladas con precaución extrema.

En E.U.A. se le considera como agente potencial del bioterrorismo; la ley exige mantener un control riguroso con registro y destrucción de todas las cepas aisladas identificadas como *Coccidioides* spp¹².

Discusión y Conclusiones

La coccidioidomicosis se ha incrementado considerablemente en Arizona y California y en los estados de la frontera Norte de México, por los efectos del cambio climático global en marcha¹³. Se le considera una enfermedad emergente en los estados brasileños del Noroeste: Piauí¹⁴, Maranhao, Bahía y Ceará¹⁵, asociado a la caza de armadillos; entre agosto/2003 y julio/2006 se duplicó el número de los casos conocidos. Existe también en la Patagonia y el Gran Chaco de Argentina, en regiones del Paraguay^{16,17} y en los estados venezolanos de Lara, Falcón y las penínsulas de Paraguaná y Guajira en Colombia¹⁸. Cada año se reconocen nuevas áreas geográficas donde el hongo había estado presente sin ser reconocido; probablemente, su hábitat sea mucho mayor de lo que hoy conocemos. Además, en toda América se

ha observado un incremento de las migraciones humanas y de los viajes en avión, circunstancias que seguramente facilitarán el contagio y la aparición de casos nuevos en lugares inesperados¹⁹⁻²¹.

El laboratorio, junto con el estudio clínico-epidemiológico y la publicación de los nuevos casos, permitirá ampliar las observaciones y mejorar así los registros y la calidad de la información disponible; este trabajo sucinto es un esbozo preliminar de lo poco que sabemos, y de lo mucho que queda por investigarse.

Agradecimientos. Trabajo dedicado a la memoria ilustre de mi Maestro en Micología Médica, Profesor Dr. Don Antonio González-Ochoa, Dermatólogo Tropicalista e Investigador distinguido del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México.

Resumen

Coccidioides immitis y *Coccidioides posadasii* dos agentes causales de la coccidioidomicosis se diagnostican por microscopia directa, cultivo, métodos serológicos y la prueba cutánea con la coccidioidina micelial. La identificación de las esferas por examen microscópico, después de añadir KOH es rápida y puede acelerar el diagnóstico. La histopatología de los tejidos inflamados demuestra la inflamación aguda, granulomatosa crónica o mixta, en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina o argéntica-metenamina de Grocott. El aislamiento del *Coccidioides* spp. por cultivo no es difícil, el hongo crece en todos los medios micológicos después de 5 a 7 días de incubación, pero el laboratorio debe mantener un nivel de seguridad biológica 2 a 3. La identificación fenotípica a nivel de género se realiza por visualización de las artroconidias en el cultivo. Los aislamientos del *Coccidioides* spp. se confirman por medio de sondas moleculares y la separación de las dos especies requiere de técnicas moleculares especializadas, disponibles en laboratorios de referencia. La inmunodifusión y el ensayo inmunoenzimático se usan para detectar la presencia de anticuerpos de las clases IgM o IgG en el suero. La medición secuencial de la fijación del complemento, es útil para valorar el pronóstico de la coccidioidomicosis.

Referencias bibliográficas

- 1.- Carrada-Bravo T. *Coccidioides immitis* un problema de salud pública. Avances recientes y perspectivas futuras. Piel 1994; 9: 274-84.
- 2.- Carrada-Bravo T. La coccidioidomicosis pulmonar y sistémica. Avances recientes y perspectivas. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1996; 9: 70-84.
- 3.- Chaturvedi V, Ramani R, Gromadzki S, Rodeghier B, Chang H G, Morse D L. Coccidioidomycosis in New York State. Emerg Infect Dis 2000; 6: 25-9.
- 4.- Saubolle M A. Laboratory aspects in the diagnosis of Coccidioidomycosis. Ann N Y Acad Sci 2007; 1111: 301-14.
- 5.- Wieden M A, Saubolle M A. The histopathology of coccidioidomycosis. En: Einstein HE, Catanzaro A eds. Coccidioidomycosis Proceedings of the 5th International Conference. Washington, DC: National Foundation for Infectious Diseases, 1996; pp 12-7.
- 6.- Avilés-Salas A, Quintero-Cuadra Y, Cornejo-Juárez P. Coccidioidomycosis

- extrapulmonar: Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24: 398-401.
- 7.- Kaufman L, Sekhon A S, Moledina N, Jalbert M, Pappagianis D. Comparative evaluation of commercial Premier EIA and microimmune diffusion and complement fixation tests for *Coccidioides immitis* antibodies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 618-9.
 - 8.- Zartarian M, Peterson E M, de la Maza L M. Detection of antibodies to *Coccidioides immitis* by enzyme immune assay. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 148-53.
 - 9.- Smith C E, Saito M T. Pattern of 39,500 serologic tests in coccidioidomycosis. *JAMA* 1956; 160: 546-52.
 - 10.- Kwon-Chung K J, Bennett J E. Coccidioidomycosis. En: Kwon-Chung KJ ed. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger 1992 pp 356-96.
 - 11.- González-Ochoa A. Coccidioidomycosis in Mexico. En: Ajello L. ed. *Coccidioidomycosis. Proceedings of Second Coccidioidomycosis Symposium*. Tucson: University of Arizona Press 1967; pp 293-300.
 - 12.- Crum N F. Coccidioidomycosis: a descriptive survey of a reemerging disease. *Clinical characteristics and current controversies*. *Medicine* 2004; 83: 149-75.
 - 13.- Park B J, Sigel K, Vaz V, Komatsu K, McRill C, et al. An epidemic of Coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes 1998-2001. *J Infect Dis* 2005; 191: 1981-7.
 - 14.- Wanke B, Lazera M, Montero PC, Lima F C, Leal M J, Ferreira-Filho P L, et al. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia* 1999; 148: 57-67.
 - 15.- Cordeiro R A, Brilhante R S, Rocha M F, Bandeira S P, Fachine M A, de Camargo Z P, et al. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 65-72.
 - 16.- Negroni R. Evolución de los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la coccidioidomycosis en las Américas. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40: 246-56.
 - 17.- Canteros C E, Toranzo A, Ibarra-Camou B, Davd V, Carrizo S G, Santillan-Iturres A, et al. La coccidioidomycosis en Argentina, 1892-2009. *Rev Argent Microbiol* 2010; 42: 261-8.
 - 18.- Borelli D, Maigualida-Pérez B, Molina T B. Coccidioidomycosis: un caso más en el bosque muy seco tropical. *Dermatol Venezol* 1991; 29: 119-23.
 - 19.- Negroni R, Arechavala A, Malolo E. Coccidioidomycosis. *Med Cutan Iber Lat Am* 2010; 38: 179-88.
 - 20.- Kirkland T N, Fierer J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerg Infect Dis* 1996; 3: 192-9.
 - 21.- Carrada-Bravo T. La coccidioidomycosis en los niños. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1989; 46: 507-14.