

## Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*

C.E. CANTEROS<sup>1\*</sup>, R.H. IACHINI<sup>2</sup>, M.C. RIVAS<sup>1</sup>, O. VACCARO<sup>3</sup>, J. MADARIAGA<sup>2</sup>, R. GALARZA<sup>2</sup>, L. SNAIDERMAN<sup>2</sup>, M. MARTÍNEZ<sup>2</sup>, M. PALADINO<sup>2</sup>, G. CICUTTIN<sup>2</sup>, E. VARELA<sup>3</sup>, E. ALCOBA<sup>4</sup>, F. ZUIANI<sup>1</sup>, J.H. SAHAZA<sup>5</sup>, M.L. TAYLOR<sup>5</sup>, G. DAVEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento Micología, INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sarsfield 563 (1281), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>Instituto Municipal de Zoonosis "Luis Pasteur", Ciudad Autónoma de Buenos Aires; <sup>3</sup>Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; <sup>4</sup>Hospital Municipal de Oncología Marie Curie, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; <sup>5</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México DF, México.

\*Correspondencia. E-mail: ccanteros@anlis.gov.ar

### RESUMEN

Se comunica el primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* de un murciélago macho de la especie *Eumops bonariensis*, capturado en la ciudad de Buenos Aires en 2003. Los aislamientos fueron recuperados de bazo e hígado e identificados fenotípicamente. Se los comparó por PCR, con 17 aislamientos clínicos, 12 de pacientes residentes en la ciudad de Buenos Aires y cinco de otros países de América, usando los iniciadores 1283, (GTG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub> y M13. Con los cuatro iniciadores, los perfiles de los aislamientos de murciélago resultaron idénticos entre sí y más relacionados a los de pacientes de Buenos Aires que a los de otros países (porcentaje de similitud: 91-100% y 55-87%, respectivamente). La alta relación genética entre los aislamientos obtenidos del murciélago y de los humanos residentes en Buenos Aires sugiere una fuente común de infección. Este es el primer registro de *E. bonariensis* infectado con *H. capsulatum* en el mundo, y el primer aislamiento del hongo en la población de quirópteros de la Argentina. Así como estos mamíferos actúan como reservorio y dispersan el hongo en la naturaleza, la infección en murciélagos urbanos podría asociarse al elevado número de casos de histoplasmosis entre pacientes inmunodeprimidos en la ciudad de Buenos Aires.

**Palabras clave:** *Histoplasma capsulatum*, epidemiología, murciélagos, reservorio, Argentina

### SUMMARY

**First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*.** We report the first isolation of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* from a male bat *Eumops bonariensis* captured in Buenos Aires city in 2003. The pathogen was recovered from spleen and liver specimens, and was identified by its phenotypic characteristics. PCR with primers 1283, (GTG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub> and M13 was used to compare both bat isolates with 17 human isolates, 12 from patients residing in Buenos Aires city, and 5 from other countries of the Americas. The profiles obtained with the four primers showed that both bat isolates were identical to each other and closer to Buenos Aires patients than to the other isolates (similarity percentage: 91-100% and 55-97%, respectively). The high genetic relationship between bat isolates and those from patients living in Buenos Aires suggests a common source of infection. This is the first record of *E. bonariensis* infected with *H. capsulatum* in the world, and the first isolation of the fungus in the Argentinean Chiroptera population. In the same way as these wild mammals act as reservoir and spread the fungus in the natural environment, infection in urban bats could well be associated with the increase in histoplasmosis clinical cases among immunosuppressed hosts in Buenos Aires city.

**Key words:** *Histoplasma capsulatum*, epidemiology, bats, reservoir, Argentina

### INTRODUCCIÓN

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, agente etiológico de la histoplasmosis, es un hongo termodimorfo que habita suelos con alto contenido de nitrógeno, especialmente aquellos enriquecidos con guano de aves o murciélagos. Los nutrientes del guano, junto con componentes del suelo y condiciones ambientales, constituyen el nicho ecológico de este microorganismo (16, 17, 23, 46, 51). En ambientes naturales, *H. capsulatum* desarrolla una fase micelial saprobio-geofílica, con una morfología microscópica típica, representada por macro-conidios gene-

ralmente esféricos, de pared gruesa, de 8-14 µm de diámetro y con proyecciones digitiformes, microconidios ovales, de 1-4 x 2-6 µm de diámetro, e hifas delgadas y ramificadas (11). Los mamíferos, entre ellos el hombre, se infectan por la inhalación de conidios y pequeños fragmentos de hifas (50).

La enfermedad fue descrita en 1906 por Darling en un paciente que trabajaba en la construcción del Canal de Panamá (50). Sin embargo, el agente etiológico no fue aislado hasta 1934 por De Monbreun (12). Emmons lo aisló por primera vez del suelo de una madriguera de rata (14); este mismo autor fue el primero en eviden-

ciar la relación entre el hábitat del murciélago y el patógeno (15).

El primer aislamiento de *H. capsulatum* a partir de tejido de murciélago fue publicado en 1962 (42). A partir de esa fecha, diversos autores informaron sobre la infección natural por *H. capsulatum* en mamíferos silvestres, entre los que se encuentran diversas especies de murciélagos (10, 13, 19, 22, 55). La obtención del hongo a partir de varias especies de quirópteros resulta interesante desde el punto de vista epidemiológico, debido a la ubicuidad y adaptabilidad de estos animales a diferentes ambientes, características que le permiten vivir en grandes urbes y alojarse en las viviendas en estrecho contacto con humanos (52).

Existen varias enfermedades importantes asociadas a quirópteros; la histoplasmosis es una de ellas y, a diferencia de las demás, no se relaciona con la mordedura por estos mamíferos (9). El papel del murciélago como potencial reservorio y dispersor en la naturaleza de *H. capsulatum* fue propuesto por diferentes autores (8, 13, 19, 27, 44). Además, se sugiere que estos mamíferos son responsables de transportar diferentes patógenos, como *H. capsulatum* por ejemplo, entre regiones geográficas distantes (<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/02-0104.htm>).

El hábitat donde *H. capsulatum* es más frecuentemente aislado son cavernas, cuevas, minas, túneles, criptas, alcantarillas y casas abandonadas, en la mayoría de los casos relacionado a áreas rurales. Sin embargo, existen antecedentes de aislamientos en espacios abiertos de zonas urbanas donde el patógeno fue recuperado de excretas de aves en parques públicos, y de guano de murciélagos en unidades habitacionales (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>, 48). Se han registrado brotes urbanos de la enfermedad; el más importante de ellos ocurrió en Indianápolis y estuvo relacionado a un área densamente poblada en el centro de la ciudad, aunque el origen del brote no fue determinado (41, 57). Otros brotes urbanos fueron asociados con plantas de interior y fertilizantes orgánicos enriquecidos con guano de aves y/o murciélagos (composta), como los ocurridos en Medellín, Colombia (20) y en Acapulco, México (30, 49).

En Argentina, la mayoría de los estudios epidemiológicos sobre histoplasmosis fueron dirigidos a determinar su endemicidad a través de la detección de la inmunidad celular (respuesta cutánea a la histoplasmina) (24 - 26, 37, 39, 53, 54) y del registro de casos clínicos autóctonos (3, 31, 34). Muy pocos fueron encaminados a determinar el reservorio del agente etiológico y sus formas de dispersión (36), lo que explica la ausencia de informes de infección de murciélagos por *H. capsulatum* en el país. Se calcula que entre 30 y 40% de la población humana del área endémica de histoplasmosis, en la que se encuentra ubicada la ciudad de Buenos Aires, tuvo contacto inmunosensibilizante con el hongo (31). Sin embargo, las fuentes de infección y el papel de los

quirópteros en el ciclo biológico del hongo no ha sido explorado.

Con el incremento de los casos clínicos de histoplasmosis diseminada grave, debido al aumento de la población inmunodeprimida, la identificación de las fuentes de infección en sitios con alta densidad demográfica, como la capital de Argentina, se hace necesario.

En este trabajo se informa el primer aislamiento de *H. capsulatum* a partir de un murciélago capturado en la ciudad de Buenos Aires. Con el fin de apoyar la hipótesis de la existencia de patrones moleculares-geográficos del hongo dispersado por hospederos silvestres, el microorganismo fue comparado genotípicamente con aislamientos de pacientes residentes en la misma ciudad y con los de otros países del continente americano. Se discuten los alcances del hallazgo en salud pública, los antecedentes en el tema y las recomendaciones para vigilar y prevenir brotes de histoplasmosis en la ciudad de Buenos Aires.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Murciélagos

Se procesaron 75 ejemplares de quirópteros, capturados entre marzo de 2001 y agosto de 2003, recibidos en el Instituto de Zoonosis "Luis Pasteur" de Buenos Aires para estudio de virus rábico. Los lugares de captura fueron registrados para ubicarlos dentro de los barrios en los que se divide la ciudad de Buenos Aires (Figura 1). Los murciélagos fueron taxonómicamente identificados en el museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, de acuerdo con sus características morfológicas y morfométricas (1). Los animales negativos a la infección por virus rábico fueron conservados a -20 °C hasta el momento del estudio micológico. Para el procesamiento microbiológico e histopatológico, se tomaron muestras de bazo, hígado, riñón, pulmón e intestino.

### Estudios microbiológicos

Fragmentos de los órganos fueron macerados y cultivados en agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol (250 µg/ml) y cicloheximida (400 µg/ml) e incubados a 28 °C. Los cultivos fueron observados semanalmente hasta la aparición de colonias filamentosas sugestivas de *H. capsulatum*. Los tubos sin crecimiento colonial a los 40 días de incubación, y/o con desarrollo de hongos contaminantes, fueron descartados.

Los aislamientos fúngicos con macromorfología sugestiva de *H. capsulatum* fueron identificados por sus características micromorfológicas, habilidad de conversión termodimorfa (50) y la presencia de antígenos H y/o M, específicos de especie, en el sobrenadante del cultivo a 28 °C en GYE (glucosa 1%, extracto de levadura 0,5%). Los antígenos fueron evidenciados por inmunodifusión doble (IDD) (32) utilizando suero inmune específico, frente a un control positivo con los antígenos de referencia (IMMY Immuno-Mycolitics, Inc Norman, OK).

### Estudios histopatológicos

Se realizaron cortes histológicos de los órganos del murciélago con aislamiento positivo para *H. capsulatum*, los que se analizaron previa tinción con hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff, Grocott y Giemsa.

### Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de murciélago fueron comparados por ensayos moleculares de PCR con

**Tabla 1.** Datos de las mezclas de reacción y programas de amplificación utilizados para cada iniciador

	Iniciador			
	1283	M13	(GTG) <sub>5</sub>	(GACA) <sub>4</sub>
Amortiguador de reacción 10x (Invitrogen)	1x	1x	1x	1x
Cloruro de magnesio (mM)	2	1,5	1,5	1,5
dNTPs (mM) (Promega)	200	200	200	200
Taq polimerasa (U) (Invitrogen)	1	2,5	2,5	2,5
Acetato de magnesio (mM)	-	3	3	3
Iniciador (ng)	44	30	30	30
ADN genómico (ng)	10	10	10	10
Volumen final de reacción (µl)	25	50	50	50
Programa de amplificación	94 °C 7 min, 35 ciclos 94 °C 10 s, 36 °C 30 s, 72 °C 1 min y una extensión final de 72 °C 5 min.	35 ciclos 94 °C 20 s, 50 °C 1 min, 72 °C 20 s y una extensión final de 72 °C 6 min.		

12 aislamientos clínicos de pacientes residentes en la misma ciudad y cinco aislamientos recuperados de pacientes de otros países americanos (EH-544 y EH-542 de Colombia, EH-538 y EH-325 de México, y la cepa Downs de Estados Unidos de América). La extracción y purificación del ADN se realizó a partir de un cultivo de fase levaduriforme de 86 hs. con agitación orbital (120 rpm) a 37 °C en GYE, utilizando la técnica de extracción de Möller *et al.* (29) y la de purificación descrita por Perrotta *et al.* (33).

Se utilizaron cuatro iniciadores en forma individual: 1283 (5'-AACGCGCAAC-3'), M13 (5'-GAGGGTGGGGTTCT-3'), (GACA)<sub>4</sub> y (GTG)<sub>5</sub>. Las condiciones metodológicas para cada iniciador se detallan en la Tabla 1. La amplificación fue realizada en un termociclador Perkin Elmer Mod 9600 ver. 2.01 (Cetus Norwalk, CT). Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1,5% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM pH 8,5) y teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml). Se utilizó 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Life Technologies Tech-line, USA) como patrón de pares de bases.

Los perfiles de los fragmentos de ADN amplificados fueron capturados con un fotodocumentador (BioRad Gel Doc 1000, CA), digitalizados, analizados y graficados con el programa BioNumerics® Ver 3.0, Applied Maths, Belgium (<http://www.applied-maths.com>), utilizando el coeficiente de Dice y el método de agrupación UPGMA (unweighted pair group method analysis). Para comparar los perfiles electroforéticos se estableció la tolerancia en 1,2 % y la optimización en 10 % para los cuatro iniciadores. El valor de corte para definir los grupos principales del dendrograma y la correlación cofenética (c) fueron calculados con el mismo programa, este último valor con el fin de confirmar la confiabilidad de las agrupaciones.

## RESULTADOS

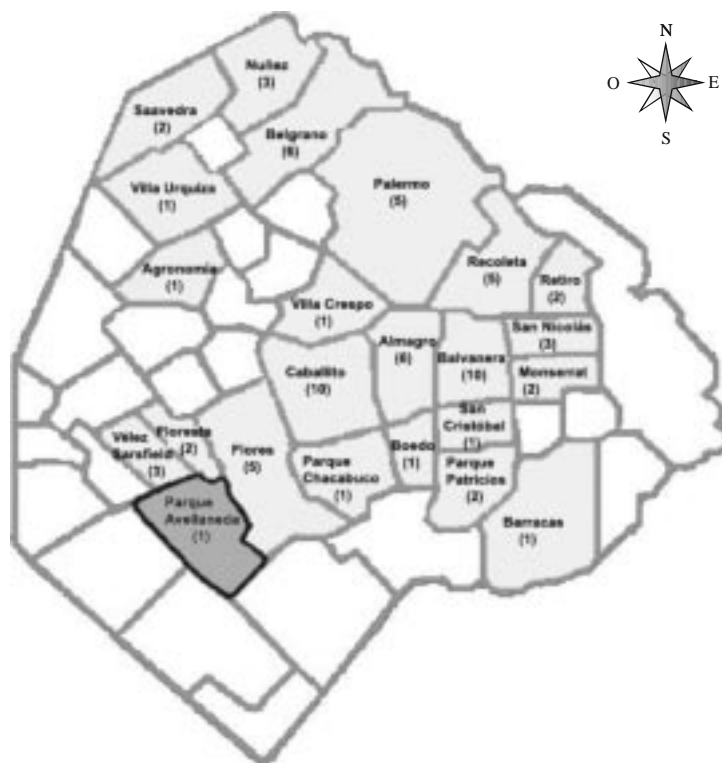
Los 75 murciélagos capturados fueron clasificados como: 66 *Tadarida brasiliensis*, cuatro *Molossus molossus*, tres *Eumops bonariensis*, un *Lasiurus blossevillii* y un *L. cinereus*. El lugar de captura correspondió a 23 de los 47 barrios de la ciudad de Buenos Aires, como se indica en la Figura 1. El barrio de procedencia de un espécimen no fue identificado. Del total de murciélagos

estudiados se obtuvo desarrollo de *H. capsulatum* a partir de bazo e hígado de un ejemplar macho, adulto, de la especie *E. bonariensis*, capturado en el barrio Parque Avellaneda en el mes de marzo de 2003. Los demás órganos cultivados del mismo espécimen (riñón, pulmón e intestino) fueron negativos al aislamiento fúngico.

Las colonias de *H. capsulatum* presentaron un crecimiento inicial blanco, tornándose parduscas, con bordes irregulares, de textura aterciopelada y superficie plana. Al examen microscópico se observaron abundantes microconidios de entre 1 y 3 µm de diámetro y macroconidios esféricos con prolongaciones digitiformes propios de la especie; el diámetro promedio de los macroconidios para el aislamiento de bazo fue de 9,1 µm y para el de hígado de 9,9 µm. Ambos aislamientos se convirtieron a levaduras a 37 °C en agar infusión-cerebrocorazón (Difco Laboratories, Detroit, MI) adicionado con cisteína al 0,1%. La presencia de los exoantígenos H y M fue confirmada por IDD.

Los especímenes fúngicos caracterizados fueron incluidos en la colección de hongos del Departamento de Micología del INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, con los números 031755 (acrónimo 650-B) y 031756 (acrónimo 650-H), procedentes de bazo e hígado, respectivamente.

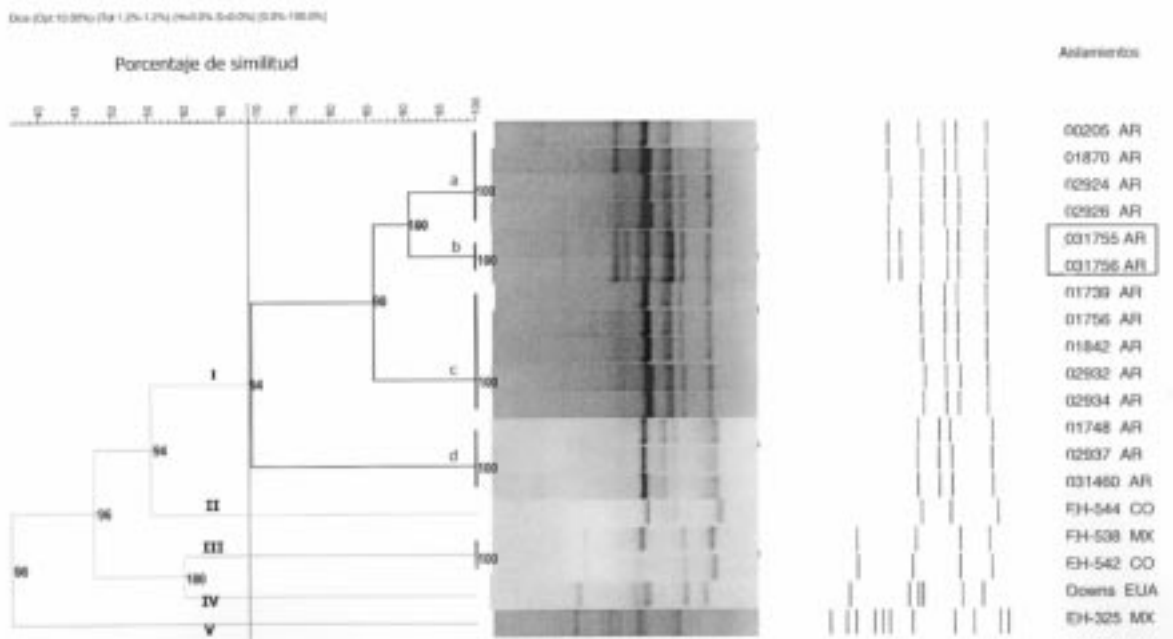
Los estudios histopatológicos de los órganos del murciélago infectado no revelaron la presencia del agente fúngico en ninguna de las tinciones realizadas. En el pulmón, por la tinción de HE, se observaron hemostesidrofagos compatibles con hemorragia antigua e histiocitos activados. En bazo, hígado, riñón e intestino no se observaron alteraciones histopatológicas a la observación microscópica. Ningún tejido presentó reacción inflamatoria. Los cortes histológicos estudiados se depositaron en la colección del Hospital de Oncología Marie Curie, con el número 156.644.



■ Barrio de captura del murciélago infectado  
 □ Barrio con capturas de murciélagos

Entre paréntesis se indica el número de especímenes capturados

**Figura 1.** Localización y número de murciélagos capturados en los diferentes barrios de la ciudad de Buenos Aires.



Para el análisis se utilizó el programa BioNumerics©. Los valores indicados en cada nodo del dendrograma corresponden a la correlación cofenética.

☒ Aislamientos de murciélago, AR: Argentina, CO: Colombia, MX: México, EUA: Estados Unidos de América. Los aislamientos 02934 y EH-538 no amplificaron con este iniciador.

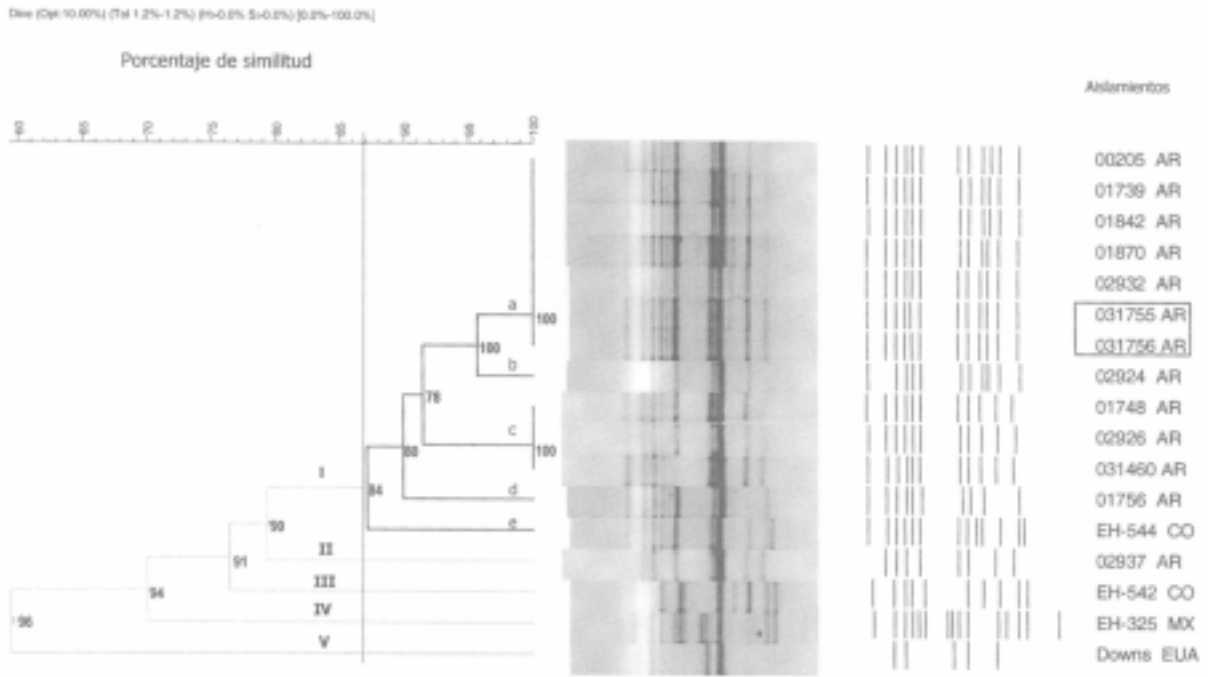
**Figura 2.** Dendrograma, gel digitalizado y perfil de bandas derivados de los patrones electroforéticos del ADN genómico de *H. capsulatum*, obtenido por PCR con el iniciador 1283.

**Tabla 2.** Relación entre los aislamientos según su procedencia geográfica y genotipos encontrados

Aislamiento	Procedencia geográfica	Origen	Genotipo			
			1283	M13	(GTG) <sub>5</sub>	(GACA) <sub>4</sub>
00205 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-a	I-a	I-a	I-a
02924 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-a	I-b	I-b	I-a
01870 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-a	I-a	II	I-a
02926 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-a	I-c	NA	I-a
031755 <sup>(1)</sup>	Argentina	Murciélago (bazo)	I-b	I-a	I-a	I-a
031756 <sup>(1)</sup>	Argentina	Murciélago (hígado)	I-b	I-a	I-a	I-a
01739 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-c	I-a	I-a	I-a
01842 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-c	I-a	I-a	I-a
01756 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-c	I-d	I-a	I-a
02932 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-c	I-a	I-b	I-a
02934 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-c	NA	I-a	I-b
01748 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-d	I-c	I-a	I-b
02937 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-d	II	I-a	IV
031460 <sup>(1)</sup>	Argentina	Humano	I-d	I-c	I-a	V
EH-544 <sup>(2)</sup>	Colombia	Humano	II	I-e	IV	I-c
EH-542 <sup>(2)</sup>	Colombia	Humano	III	III	III	II
EH-538 <sup>(3)</sup>	México	Humano	III	NA	NA	NA
Downs <sup>(2)</sup>	EUA	Humano	IV	V	VI	VI
EH-325 <sup>(3)</sup>	México	Humano	V	IV	V	III

<sup>(1)</sup>Colección de cultivos del Departamento Micología del INEI ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Argentina, <sup>(2)</sup>Cepas donadas por la Dra. Angela Restrepo (EH-544, acrónimo JG y EH-542, acrónimo RG) y por el Dr. George S. Kobayashi (Downs), <sup>(3)</sup>Colección de cultivos de *Histoplasma capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos, Facultad de Medicina. UNAM.

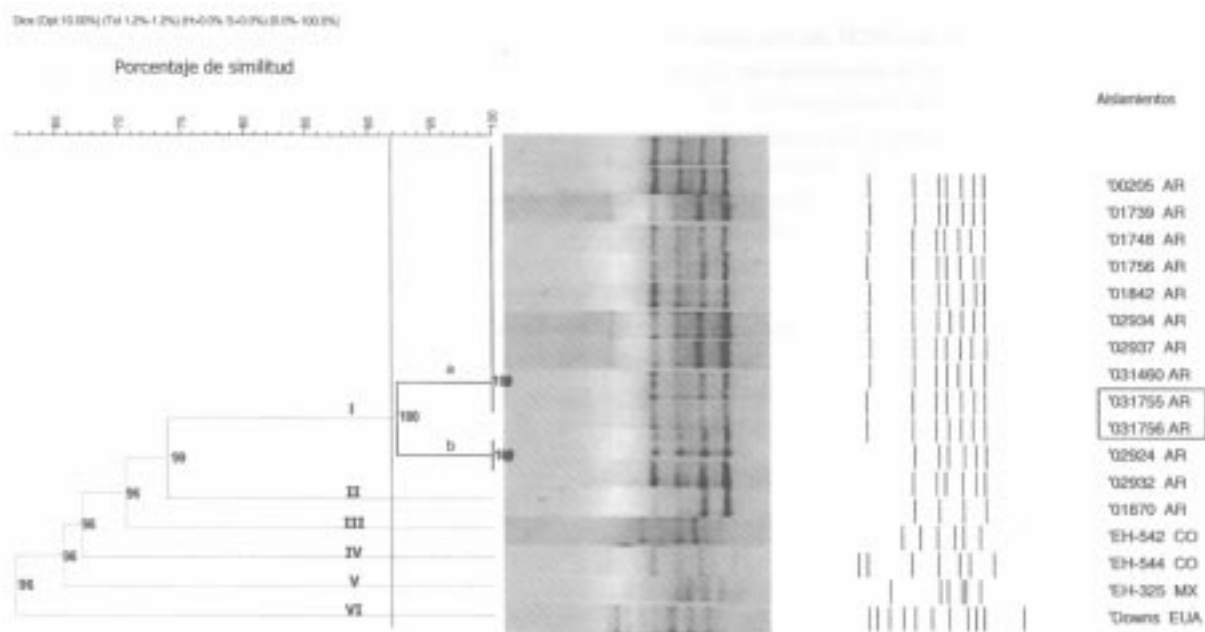
NA: no amplificada  
EUA: Estados Unidos de América



Para el análisis se utilizó el programa BioNumerics®. Los valores indicados en cada nodo del dendrograma corresponden a la correlación cofenética.

☒ Aislamientos de murciélago, AR: Argentina, CO: Colombia, MX: México, EUA: Estados Unidos de América. Los aislamientos 02934 y EH-538 no amplificaron con este iniciador.

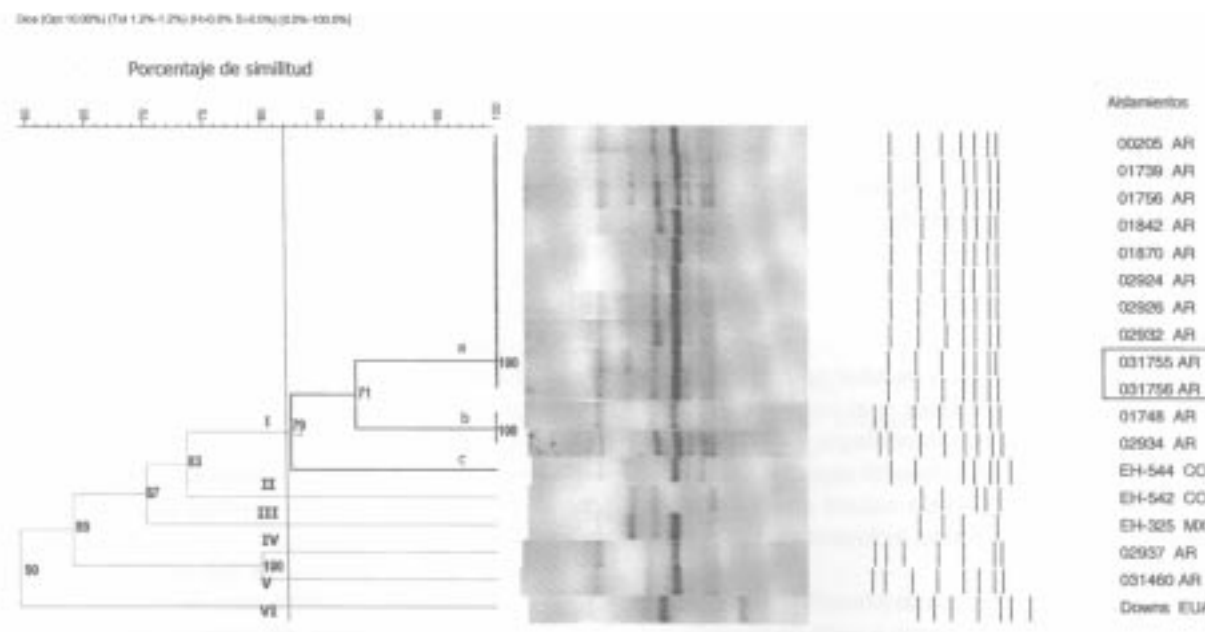
**Figura 3.** Dendrograma, gel digitalizado y perfil de bandas derivados de los patrones electroforéticos del ADN genómico de *H. capsulatum*, obtenido por PCR con el iniciador M13.



Para el análisis se utilizó el programa BioNumerics®. Los valores indicados en cada nodo del dendrograma corresponden a la correlación cofenética.

☒ Aislamientos de murciélago, AR: Argentina, CO: Colombia, MX: México, EUA: Estados Unidos de América. Los aislamientos 02926 y EH-538 no amplificaron con este iniciador.

**Figura 4.** Dendrograma, gel digitalizado y perfil de bandas derivados de los patrones electroforéticos del ADN genómico de *H. capsulatum*, obtenido por PCR con el iniciador (GTG)<sub>5</sub>



Para el análisis se utilizó el programa BioNumerics®. Los valores indicados en cada nodo del dendrograma corresponden a la correlación cofenética.

☒ Aislamientos de murciélago, AR: Argentina, CO: Colombia, MX: México, EUA: Estados Unidos de América. El aislamiento EH-538 no amplificó con este iniciador

**Figura 5.** Dendrograma, gel digitalizado y perfil de bandas derivados de los patrones electroforéticos del ADN genómico de *H. capsulatum*, obtenido por PCR con el iniciador (GACA)<sub>4</sub>

El análisis genotípico por PCR de los aislamientos estudiados se muestra en la secuencia de las figuras 2-5, donde se observan los dendrogramas, las imágenes digitalizadas de los geles y los perfiles de bandas para cada iniciador, tanto para los aislamientos de murciélago como para los de humanos, utilizados para comparación. Los grupos principales y subgrupos, generados por el dendrograma, están indicados con números romanos y letras, respectivamente.

Con los cuatro iniciadores probados los aislamientos del murciélago fueron idénticos entre sí, se agruparon con los aislamientos clínicos de Buenos Aires (ACBA) y se diferenciaron claramente de los de otros países. Los porcentajes de similitud encontrados fueron: 100% con ocho ACBA para los iniciadores (GTG)<sub>5</sub> y (GACA)<sub>4</sub>, 100% con cinco ACBA para M13 y 91% con cuatro ACBA para el iniciador 1283 (Figuras 2-5).

El 100% de los aislamientos de Argentina mostraron un único genotipo (I) cuando se utilizó el iniciador 1283 (Figura 2 y Tabla 2). Los iniciadores, M13 y (GTG)<sub>5</sub>, separaron cada uno un ACBA fuera del grupo I, 02937 y 01870, respectivamente (Figuras 3 y 4, Tabla 2). El iniciador (GACA)<sub>4</sub> separó dos ACBA, 02937 y 031460, con genotipos disimiles (IV y V) (Figura 5, Tabla 2). Tres aislamientos no amplificaron, el 02926 con el iniciador (GTG)<sub>5</sub>, el 02934 con el iniciador M13 y el EH-538 con M13, (GTG)<sub>5</sub> y (GACA)<sub>4</sub> en las condiciones de nuestra experiencia (Tabla 2).

La confiabilidad de las agrupaciones que incluyen los aislamientos de murciélagos y los ACBA fue muy buena, ya que *c* varió de 76 a 100, según se señala en el nodo del grupo correspondiente de cada dendrograma. Como se indican en las figuras 2 y 4, la mayor confiabilidad de asociación para los aislamientos de murciélagos y los ACBA se encontró con los iniciadores 1283 y (GTG)<sub>5</sub> (*c* = 94 y 100, respectivamente).

## DISCUSIÓN

Este es el primer registro mundial de *H. capsulatum* aislado a partir *E. bonariensis*, y el primer aislamiento del hongo en población de murciélagos en la República Argentina. A la fecha, se suman 38 especies de murciélagos descritas con infección natural por el patógeno en distintos países del mundo, incluyendo la del presente informe (Tabla 3).

La mayoría de los estudios de infección en quirópteros fueron dirigidos a aislar el hongo a partir de murciélagos de hábitat cavernícola. Los porcentajes de infección variaron entre menos de 0,1 a 66%, dependiendo de la topografía de la cueva, el tamaño de la colonia y de las especies capturadas (4, 7, 28, 46).

El presente trabajo es un estudio pionero sobre la búsqueda de *H. capsulatum* en población de murciélagos residentes en una zona altamente urbanizada y en-

démica para histoplasmosis. La ciudad de Buenos Aires posee una densidad demográfica de 13.679,6 habitantes/km<sup>2</sup> (<http://www.indec.mecon.ar>) y una estrecha relación de convivencia entre estos mamíferos y los ciudadanos de la misma (52). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que el porcentaje de murciélagos infectados en forma natural (1/75) en espacios abiertos de esta urbe no es elevado. Sin embargo, sería importante aumentar el número del muestreo y realizar estudios dirigidos a colonias de este mamífero, tanto de especímenes residentes como de los que realizan movimientos migratorios conocidos dentro de la República Argentina. De las cinco especies de murciélagos estudiadas, dos (*M. molossus* y *T. brasiliensis*) figuran en trabajos previos relacionados a la infección por *H. capsulatum*. La especie *E. bonariensis* es insectívora, se distribuye desde el sur de Veracruz, México, hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, y se desconocen sus hábitos migratorios (35). Se sugiere que las especies migratorias, tanto las que realizan movimientos de corta como de larga distancia, se desplazan por cambios climáticos o por búsqueda de alimento. Muchas de sus rutas migratorias no están bien definidas e incluso se plantea que habiendo disponibilidad de alimento la especie se comporta como residente (38).

Existen diversos planteamientos de cómo el murciélago participa en el ciclo biológico de *H. capsulatum*. Klite y Diercks (22) aislaron por primera vez *H. capsulatum* a partir del contenido intestinal de murciélagos naturalmente infectados, sugiriendo que estos mamíferos a través de las heces pueden eliminar el patógeno hacia el ambiente, donde encuentra las condiciones propicias para desarrollar la fase micelial infectiva. McMurray y Greer (27) corroboraron lo antes referido recuperando el agente de heces de murciélagos infectados intranasalmente, y propusieron este mecanismo como forma de dispersión del hongo en la naturaleza.

Taylor *et al.*, (45) por su parte, sugieren además que *H. capsulatum* también puede integrarse al medio por los cadáveres de murciélagos infectados, desarrollando la fase micelial infectiva favorecida por las condiciones del hábitat (cuevas u oquedades oscuras, húmedas y con acúmulos de guano). Tal aseveración es sostenida por la presencia de murciélagos momificados que caen al suelo o de cadáveres de estos animales que son degradados por la microbiota del suelo.

La ausencia de estructuras parasitarias de *H. capsulatum* en los cortes histológicos de los órganos infectados del *E. bonaerensis*, así como la falta de reacción celular, concuerda con lo observado por otros autores en otras especies de murciélagos, que también refieren histopatologías no sugestivas. Tal observación apoya al cultivo como el método más eficiente para detectar infección por este hongo (18, 46).

Considerando que *H. capsulatum* puede presentar reproducción sexual en su ciclo de vida en el medio ambien-

**Tabla 3.** Especies de murciélagos con aislamiento positivo de *H. capsulatum*

Familias / género y especies	País de origen
<i>Mormoopidae</i>	
<i>Mormoops blainvillii</i>	Cuba
<i>Mormoops megalophylla</i>	México
<i>Pteronotus davyi</i>	México
<i>Pteronotus parnellii</i> ( <i>Chilonycteris rubiginosa</i> )	Panamá, Belice, México
<i>Pteronotus gymnotus</i> ( <i>P. suapurensis</i> )	Panamá
<i>Phyllostomidae</i>	
<i>Artibeus hirsutus</i>	México
<i>Artibeus jamaicensis</i>	El Salvador, Cuba
<i>Brachyphylla cavernarum</i>	Puerto Rico
<i>Brachyphylla nana</i>	Cuba
<i>Carollia perspicillata</i>	Panamá, Colombia, Ecuador
<i>Desmodus rotundus</i>	Panamá, Colombia
<i>Glossophaga soricina</i>	Panamá, Colombia
<i>Leptonycteris curasoae</i> ( <i>L. sanborni</i> )	EUA, México
<i>Leptonycteris nivalis</i>	México
<i>Lonchophylla robusta</i>	Panamá
<i>Lonchorhina aurita</i>	Panamá
<i>Macrotus waterhousii</i>	Cuba
<i>Micronycteris megalotis</i>	Panamá
<i>Phyllostomus discolor</i>	Panamá, El Salvador
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Panamá
<i>Tonatia bidens</i>	Panamá
<i>Vespertilionidae</i>	
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	Colombia
<i>Eptesicus fuscus</i>	EUA, Cuba
<i>Myotis austroriparius</i>	EUA
<i>Myotis californicus</i>	México
<i>Myotis grisescens</i>	EUA
<i>Myotis lucifugus</i>	EUA
<i>Myotis myotis</i>	Israel
<i>Myotis sodalis</i>	EUA
<i>Nycticeius humeralis</i>	EUA
<i>Pipistrellus subflavus</i>	EUA
<i>Molossidae</i>	
<b><i>Eumops bonariensis</i></b>	<b>Argentina</b>
<i>Molossus molossus</i>	Panamá, Ecuador
<i>Molossus</i> sp.	Panamá
<i>Nyctinomops laticaudatus</i> ( <i>Tadarida yucatanica</i> )	Panamá
<i>Tadarida brasiliensis</i> ( <i>T. cynocephala</i> )	EUA
<i>Noctilionidae</i>	
<i>Noctilio albiventris</i> ( <i>N. labialis</i> )	Panamá
<i>Natalidae</i>	
<i>Natalus stramineus</i>	México

Las especies de murciélagos incluidas en esta tabla corresponden a las referencias de Constantine (10), Di Salvo (13), Hoff (19), Klite (22), Vargas Yañez (55), e incluyen el actual informe. La nomenclatura de la cita original aparece entre paréntesis en el caso de que las especies hayan pasado a sinonimia (58).

te, resulta curioso el bajo polimorfismo genético de los aislamientos estudiados. Con los iniciadores utilizados era de esperarse un mayor polimorfismo, aun en una misma área geográfica; sin embargo, la presencia de una población homogénea de *H. capsulatum* proveniente de pacientes argentinos fue observada en estudios previos (6, 33, 40). Recientes trabajos utilizando secuencias génicas, indican que las cepas argentinas estudiadas a la fecha conforman un grupo clonal (21, 40).

Los estudios genéticos realizados en el presente estudio revelaron patrones moleculares muy relacionados (91 y 100% de homología) entre los aislamientos de *H. capsulatum* del murciélago y los de pacientes en la misma ciudad, lo que sugeriría una fuente de infección común. Además, apoya la posibilidad de que la población de murciélagos estudiada en Buenos Aires se comporta como residente y, que debido a la disponibilidad de alimentos, no realicen movimientos a grandes distancias; sin embargo, no hay que descartar que algunas especies migratorias puedan habitar temporalmente Buenos Aires y luego desplazarse a otras zonas más lejanas. *Eumops bonariensis* convive en esta ciudad, con otras especies de murciélagos, incluyendo *T. brasiliensis* (52). Esta última especie referida realiza migraciones de larga distancia y es susceptible a la infección por *H. capsulatum*, por lo que es propuesta como potencial dispersora de cepas del hongo entre áreas geográficas distantes (47). Esto podría justificar la aparición de casos clínicos autóctonos en regiones distantes con características ecológicas distintas a las de las áreas endémicas de histoplasmosis, como el caso del brote ocurrido recientemente en la provincia de Neuquén, la cual posee un ecosistema distinto al de *H. capsulatum* (<http://www.dhsint.com/epidemiologos/buscador/abstract/159/159.pdf>).

La existencia de perfiles moleculares comunes entre hospederos silvestres y humanos dentro de una misma área geográfica, fue observada previamente (44, 45). Sin embargo, esta es la primera vez que se describen con las secuencias microsatélites M13, (GACA)<sub>4</sub> y (GTG)<sub>5</sub>. De los cuatro iniciadores ensayados, (GTG)<sub>5</sub> y 1283 fueron los más discriminatorios para diferenciar entre los aislamientos de Argentina y los de regiones geográficas distantes. El iniciador 1283 produjo mejor discriminación entre los aislamientos de la misma área geográfica (cuatro subgrupos con  $c \geq 0,90$ ). Las PCR con las secuencias microsatélites utilizadas podrían ser aplicadas como herramienta epidemiológica en la caracterización de aislamientos de *H. capsulatum* de murciélagos, tanto para revelar los sitios de infección como para aportar información de sus movimientos migratorios y vehiculización de cepas, con base en la existencia de un patrón geográfico del hongo (44, 45).

Si en Buenos Aires el murciélago actúa como dispersor y reservorio de *H. capsulatum*, podría justificarse de alguna manera el aumento de casos de histoplasmosis observados entre pacientes inmunodeprimidos en esta urbe (3).

El riesgo de brotes epidémicos en la ciudad de Buenos Aires, como los descritos en otras ciudades del mundo (2, 5, 30, 41, 43, 49, 56, 57), es real dada la frecuente exposición a guano de quirópteros de sus habitantes.

Es indiscutible la estrecha relación murciélago-histoplasmosis, independientemente de la manera de dispersar el hongo. Por lo que desde el punto de vista sanitario es importante denunciar, ante las autoridades de salud pública, la presencia de colonias de murciélagos o de grandes acúmulos de guano en edificios abandonados, altillos, taparrollos, cúpulas de edificios e iglesias. La remoción de material contaminado debe hacerse tomando las precauciones, tanto para los trabajadores que la realizan como para los que puedan estar en el área de exposición, previniendo de esa manera brotes o la adquisición de la infección por *H. capsulatum* ([www.cdc.gov/niosh/hi97146.html](http://www.cdc.gov/niosh/hi97146.html)) y, en los casos que sea necesario, proceder a la desinfección del área (10).

La presencia de fuentes comunes de infección, tanto para el hombre como para los quirópteros, justifica el apoyo a las investigaciones que permitan definir el papel de estos animales en la epidemiología de la histoplasmosis en la ciudad de Buenos Aires.

De acuerdo con el presente hallazgo y su impacto en salud pública, sería recomendable investigar la infección por *H. capsulatum* en murciélagos, aprovechando la estructura organizada del sistema de vigilancia de rabia que actualmente se lleva a cabo en forma rutinaria en nuestro país.

**Agradecimientos:** Los autores agradecemos al Dr. Miguel Ulloa y a la Dra. Viviana Ritacco por aportar sus críticas al presente manuscrito.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Barquez RM, Mares MA, Braun JK (1999) The bats of Argentina. Museum of Texas, Tech University (Ed), Lubbock, Texas.
2. Bartlett PC, Vonbehren LA, Tewari RP, Martin RJ, Eagleton L, Isaac MJ *et al.* (1982) Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. *Am. J. Public Health.* 72: 1369-1372.
3. Bava AJ (1995) Histoplasmosis in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 37: 531-535.
4. Bryles MC, Cozad GC, Robinson A (1969) Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in Oklahoma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 399-400.
5. Byrd RB, Leavey R, Trunk G (1975) The Chanute histoplasmosis epidemic. New variations of urban histoplasmosis. *Chest* 68: 791-795.
6. Canteros C, Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Tiraboschi IN, Guelfand L *et al.* (2004) . Caracterización genotípica y fenotípica de aislamientos de *Histoplasma capsulatum* de pacientes de diferentes regiones geográficas y con distintos grados de inmunocompromiso. XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología, X Congreso Argentino de Microbiología. Resumen H390, Buenos Aires, Argentina.
7. Carvajal Zamora JR (1977) Isolation of *Histoplasma capsulatum* from tissues of bats captured in the Aguas Buenas Caves, Aguas Buenas, Puerto Rico. *Mycopathologia* 60: 167-169.

8. Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR *et al.* (1998) I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 11: 187-191.
9. Child J (1994) Bat in my belfry. *The Lancet* 343: 5-6.
10. Constantine DG (1988) Health precautions for bat researchers In: Kunz TH (Ed), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Washington: Smithsonian Institution Press, London p. 491-528.
11. de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili. Reus, Spain p. 708-711.
12. De Monbreun WA (1934) Cultivation and cultural characteristics of Darling's *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Trop. Med* 14: 93-125.
13. Di Salvo AF, Ajello L, Palmer JW Jr, Winkler WG (1969) Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *Am. J. Epidemiol.* 89: 606-614.
14. Emmons CW (1949) Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Rep.* 64: 892-896.
15. Emmons CW (1958) Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Rep.* 73: 590-595.
16. González-Ochoa A (1963) Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. Mex.* 23: 81-86.
17. Goodman NL, Larsh HW (1967) Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 33: 145-156.
18. Hasenclever HF, Shacklette MH, Hunter E, George E, Schwarz J (1969) The use of cultural and histological methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* in bat: absence of a cellular response. *Am. J. Epidemiol.* 90: 77-83.
19. Hoff GL, Bigler WJ (1981) The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J. Wild Dis.* 17: 191-196.
20. Jimenez RA, Uran ME, de Bedout C, Arango M, Tobon AM, Cano LE *et al.* (2002) Brote de histoplasmosis aguda en un grupo familiar: identificación de la fuente de infección *Biomédica* 22: 155-159.
21. Kasuga T, White TJ, Koenig G, Mcewen J, Restrepo A, Castañeda E *et al.* (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* 12: 3383-3401.
22. Klite PD, Diercks FH (1965) *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the canal zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 433-439.
23. Mahvi TA (1970) Factors governing the epidemiology of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 41: 167-176.
24. Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusano G, Gorodner J (1996) Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38: 349-353.
25. Marticorena BE, Borletto N, Negroni R (1991) Estudio de un área endémica de micosis profundas en el norte de la Provincia de Córdoba. *Rev. Arg. Micología* 14: 20-23.
26. Masih D, Marticorena B, Borletto N, Farias C, Negroni R (1987) Epidemiologic study of bronchopulmonary mycosis in the Province of Córdoba, Argentina. *Rev. Med. Trop. Sao Paulo* 29: 59-62.
27. McMurray DN, Greer DL (1979) Immune response in the bat following intranasal infection with *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 1036-1039.
28. McMurray DN, Russel LH (1982) Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 527-531.
29. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 6115-6116.
30. Morgan J, Cano MV, Feikin DR, Phelan M, Monroy OV, Morales PK *et al.* (2003) A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 663-669.
31. Negroni R, Robles AM, Arechavala A (1994) Histoplasmosis progresiva. Estudio en un lapso de 10 años. *Rev. Arg. Micología* 17: 14-21.
32. Ouchterlony O, Nilsson LA (1978) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: D. M. Weir (Ed), *Handbook of experimental immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 19.1-19.44.
33. Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Rodero L, Davel G (2001) Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* mediante RAPD-PCR. *Rev. Argent. Microbiol.* 33: 160-166.
34. Pietrobon D, Negro-Marquín, Kilstein J, Galíndez J, Greca A, Battagliotti C (2004) Histoplasmosis diseminada y SIDA en un hospital argentino: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22: 156-159.
35. Reid F (1997) *A field guide to the mammals of Central America & Southeast Mexico*. Oxford University Press, New York.
36. Rodríguez de Marengo ZJ (1971) Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de una muestra de suelo de la zona del Valle de Lerma de la provincia de Salta. V Jornadas Argentinas de Micología, Resumen 12, Rosario, Argentina.
37. Rodríguez de Marengo ZJ, Araujo AC, Negroni R, Dubra F, García OE (1979) Encuesta epidemiológica de histoplasmosis en la provincia de Salta. *Rev. Arg. Micología* 2: 5-10.
38. Rojas-Martínez A, Valiente-Banuet A, Arizmendi MC, Alcántara-Eguren A, Arita HT (1999) Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist? *J. Biog.* 26: 1065-1077.
39. Rubinstein P, Negroni R (1981) Histoplasmosis. En: *Micosis broncopulmonares del adulto y el niño*, Beta S.R.L., Buenos Aires, p. 249-290.
40. Sahaza JH, Reyes-Montes MR, Zuñiga G, Bobadilla del Valle M, Canteros C, Taylor ML (2003) Variabilidad genética de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* de Latinoamérica, revelados por RAPD-PCR y secuencias parciales de cuatro genes nucleares. V Congreso sobre Biología Molecular y Celular de hongos, Resumen p. 118, Querétaro, México.
41. Schlech WF 3rd, Wheat LJ, Ho JL, French ML, Weeks RJ, Kohler RB *et al.* (1983) Recurrent urban histoplasmosis, Indianapolis, Indiana, 1980-1981. *Am. J. Epidemiol.* 118: 301-312.
42. Shacklette MH, Diercks FH, Gale NB (1962) *Histoplasma capsulatum* recovered from bat tissues. *Science* 35: 1135.
43. Stobierski MG, Hospedales CJ, Hall WN, Robinson-Dunn B, Hoch D, Sheill DA (1996) Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1220-1223.
44. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR (2000) Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet. Biol.* 30: 207-212.
45. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR, Zuñiga G (2003) Marcadores moleculares de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. V Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos, Resumen p. 117, Querétaro, México.
46. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, *et al.* (1999)

- Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61: 914-919.
47. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A (2000) Biogeografía de los polimorfismos de *Histoplasma capsulatum* asociados a patrones migratorios en murciélagos. VII Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología, Resumen p. 99, Querétaro, México.
  48. Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Romero-Martínez R (2002) Diversidad de cepas de *Histoplasma capsulatum*. En: Méndez Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F (Eds), Actualidades en Micología Médica. Contenido temático del cuarto diplomado en Micología Médica, Facultad de Medicina UNAM, México DF, p. 275-284.
  49. Taylor ML, Ruiz-Palacios GM, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Peña-Sandoval GR *et al.* (2002) Identificación de la fuente de infección de una epidemia de histoplasmosis en zona turística de Acapulco, Guerrero, México. IV Congreso Latinoamericano de Micología. Resumen p. 477, Xalapa, Veracruz, México.
  50. Tewary R, Wheat LJ, Ajello L (1998) Agents of histoplasmosis. En: Ajello L, Hay RJ (Eds), Medical Mycology, Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections 9<sup>th</sup> ed. Arnold, London, p. 373-393.
  51. Ulloa M, Lappe P, Aguilar S, Pérez-Mejía A, Torriello C, Taylor ML (1998) Hongos filamentosos asociados con el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* en Guerrero, México. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11: 173-182.
  52. Vaccaro OB, Varela EA (2001) Quirópteros de la ciudad de Buenos Aires y de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat. 3: 181-193.
  53. van Gelderen de Komaid A, Duran E, Borges de Kestelman I (1999) Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vivos, La Toma, and Choromoro - Trancas, Tucuman, Argentina. Eur. J. Epidemiol. 15: 383-388.
  54. van Gelderen de Komaid A, Duran EL, Madero AM, Carrizo V (1992) Histoplasmosis in northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucuman. Eur. J. Epidemiol. 8: 206-210.
  55. Vargas-Yañez R, Peña-Sandoval GR, Chávez-Tapia CB, Taylor ML (1998) Infección natural por *Histoplasma capsulatum* en animales silvestres. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 11: 192-194.
  56. Waldman RJ, England AC, Tauxe R, Kline T, Weeks RJ, Ajello L *et al.* (1983) A winter outbreak of acute histoplasmosis in northern Michigan. Am. J. Epidemiol. 117: 68-75.
  57. Wheat LJ, Slama TG, Eitzen HE, Kohler RB, French ML, Biesecker JL (1981) A large urban outbreak of histoplasmosis: clinical features. Ann. Intern. Med. 94: 331-337.
  58. Wilson DE, Reeder DM (1993) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, 2<sup>nd</sup> ed. Washington Smithsonian Institution Press. Washington DC, USA.