

Maestría en Microbiología Molecular
Universidad Nacional de San Martín



Vigilancia de cepas de *Histoplasma capsulatum* circulantes en Argentina

Bioquímica Belén Ibarra Camou

- 2016-

Directora: Dra. Cristina Elena Canteros

RESUMEN

Histoplasma capsulatum es un hongo termodimórfico, agente causal de la histoplasmosis, una micosis de distribución mundial con importantes zonas endémicas en el continente Americano. Los distintos genotipos y variedades de *H. capsulatum* muestran diferente distribución geográfica y manifestaciones clínicas.

En los últimos años se han utilizado técnicas moleculares para genotipificar *H. capsulatum* como: RFLP, RAPD-PCR, amplificación de la región ITS y secuencias parciales de genes específicos. Estudios de tipificación basados en el análisis de múltiples secuencias (MLST) de los genes *Arf*, *H-anti*, *Ole* y *Tub* confirman que *H. capsulatum* es un complejo de al menos 8 clados o especies filogenéticas: Australia, Países Bajos, Eurasia, Nam1, Nam2, LAmA, LAmB y África. Un reciente estudio, propone 6 nuevas especies filogenéticas en el complejo, que comprenden LAmA1, LAmA2, LAmB1, LAmB2, RJ y BAC-1. Hasta el momento, los estudios indican que la mayoría de las cepas circulantes en Argentina son LAmB.

El objetivo de este trabajo es aportar al conocimiento de la epidemiología de la histoplasmosis en la República Argentina a través de la vigilancia de genotipos de *H. capsulatum* circulantes, utilizando métodos moleculares.

Se analizaron 46 cepas depositadas en la colección de cultivo del Departamento Micología (DMic), provenientes de diferentes regiones geográficas de Argentina, y dos cepas de referencia: Downs y G186B. Se utilizaron para el análisis dos técnicas moleculares, RAPD-PCR con primer 1281-1283 y MLST (*Arf*, *H-anti*, *Ole* y *Tub*). Los perfiles originados por RAPD-PCR se analizaron con el programa BioNumerics. Las secuencias consenso obtenidas de la amplificación en ambas hebras de cada gen se alinearon y analizaron; luego se realizó un análisis de MLST de los cuatro genes. Se construyeron los árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de Jukes-Cantor en el programa MEGA v6.0. Se incluyeron en el análisis secuencias de referencia de las diferentes especies filogenéticas depositadas en el GenBank.

Se analizaron fenotípicamente 31/46 cepas; las 15 cepas restantes ingresaron a la colección antes de 2006 (año que comenzó esta investigación) y no tenían todos los datos de fenotipificación al momento de su ingreso. Veintinueve de 31 aislados presentaron macro y micromorfología compatible con *H. capsulatum*, solo dos presentaron micelio estéril. Sin embargo, todas mostraron termoconversión a levaduras a 37°C y producción de exoantígeno en medio líquido.

De las 46 cepas analizadas, 33 (71 %) mostraron un perfil de RAPD-PCR homogéneo al que denominamos Argentino (AR), las 13 (29 %) restantes mostraron diferentes perfiles a los que denominamos no Argentinos (NAR).

El árbol filogenético originado de MLST identificó 35 cepas como clado LAmB (76 %), 3 como clado NAM1 (6 %) (una de estas aislada del caso índice de un brote ocurrido en la Patagonia

Argentina) y 1 (3 %) relacionada al clado recientemente propuesto LAmA2. Las 7 cepas restantes (15 %), agruparon separadas del clado LAmB, más relacionadas a los clados LAmA y RJ; estas cepas fueron aisladas de pacientes con manifestaciones en sistema nervioso central (SNC) que habitaron en una zona geográfica particular y la mayoría sin causa de inmunocompromiso. Este clado propuesto como nuevo en Sudamérica es soportado con un bootstrap de 98 %.

El RAPD-PCR pudo identificar presuntivamente 32/35 (91 %) cepas LAmB (perfil AR), las restantes 3 cepas LAmB mostraron un perfil NAR.

La principal especie filogenética que circula en Argentina es LAmB, además se detectaron en menor proporción cepas NAm1, LAmA2 y un grupo de cepas con características patogénicas especiales como tropismo por SNC y asociado a pacientes sin causa aparente de inmunocompromiso que habitan un área geográfica específica. Para este nuevo clado proponemos el nombre de TUKMA. Nuestros resultados indican que el RAPD-PCR puede complementar al MLST y puede ser utilizado para identificar cepas del clado LAmB con muy buena sensibilidad. No obstante, el MLST es la técnica de referencia utilizada actualmente para conocer las especies filogenéticas de *H. capsulatum*.

Palabras clave: *Histoplasma capsulatum*, especies filogenéticas, MLST, RAPD-PCR.

SUMMARY

Histoplasma capsulatum is a thermally dimorphic fungus responsible of histoplasmosis, a mycosis widely distributed in the world, with extensive endemic areas in the Americas. Genotypes and varieties of *H. capsulatum* show diverse clinical manifestations and geographic distribution.

In recent years, several techniques as RFLP, RAPD-PCR, amplification of the ITS region, and partial sequences of specific genes have been used to genotype *H. capsulatum* strain. Studies based on multilocus sequence typing (MLST) of *Arf*, *H-anti*, *Ole* and *Tub* genes, confirm that *H. capsulatum* is a complex of at least eight clades or phylogenetic species: Australia, Netherlands, Eurasia, Nam1, Nam2, LAmA, LAmB and Africa. Recently, six new phylogenetic species (LAmA1, LAmA2, LAmB1, LAmB2, RJ y BAC-1) have been proposed in the complex. Both phylogenetic analyses show that LAmB strains are the most frequently in Argentina.

The aim of this work is to contribute to the knowledge of the histoplasmosis epidemiology in Argentina by surveillance of *H. capsulatum* genotypes.

Forty six isolates from the DMic Culture Collection were analyzed; they were obtained from patients residing in different geographic areas of Argentina. Two reference strains: Downs and G186B were also included. RAPD-PCR with primers 1281-1283 and DNA sequencing (genes *Arf*, *H-anti*, *Ole* and *Tub*) techniques were used. The RAPD-PCR profiles were analyzed with the BioNumerics software. The consensus sequence resulting of amplified fragments from both strands were aligned and analyzed, and then MLST was performed by DNA sequence analysis of the four gene fragments. The phylogenetic trees were constructed with the maximum likelihood method, using Jukes-Cantor as substitution model in MEGA 6 software. Sequences obtained from the GenBank database were included in the phylogenetic analysis.

Phenotyping was available for 31 of 46 strains collected from 2006. No phenotype data were register for the others 15 strains deposited at the culture collection before 2006 (year when the investigation started). 29/31 isolates showed macro and micro morphology compatible with *H. capsulatum*, the remaining two isolates had sterile mycelia. However, all isolates showed thermo-conversion into yeast at 37°C and produced exoantigen in liquid medium.

RAPD-PCR genotyping of the 46 strains tested showed a homogeneous profile in 33 strains (71 %) that we called Argentine (AR). The remaining 13 (29 %) showed different profiles, called not Argentine (NAR).

The MLST analyses typed 35 strains (76 %) as clade LAmB, 3 strains as clade NAm1 (6 %) (one of these, isolated from the index case-patient from a outbreak in Patagonia, Argentina) and, one strain (3 %) as recently proposed clade LAmA2. The remaining 7 strains (15 %) clustered separately from LAmB, and more related to LAmA and RJ; this strain group was isolate from patients with central nervous system manifestations living in a particular geographic area, and most of them without immune disorders. This clade, supported by a bootstrap value of 98 %, is proposed as a new clade in South America.

The RAPD-PCR typing identified presumptively LAmB (profile AR) in 32/35 (91 %) strains, the remaining 3 LAmB strains showed profile NAR.

The main phylogenetic species circulating in Argentina is LAmB, but there are also strains NAm1, LAmA2 and a strain group with special pathogenic characteristics (tropism for CNS in nonimmunocompromised patients living in a specific geographic area). We proposed the name TUKMA for this new clade. Our results indicate that RAPD-PCR typing can be complementary to MLST and can be used to identify clade LAmB strains with good sensitivity. However, MLST is the gold standard genotyping technique for identification of *H. capsulatum* phylogenetic species.

Key word: *Histoplasma capsulatum*, phylogenetic species, MLST, RAPD-PCR.

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	9
<i>Histoplasma capsulatum</i>	9
Historia de la histoplasmosis.....	10
Manifestaciones Clínicas	12
Epidemiología de la histoplasmosis en Argentina.....	13
Diagnóstico de la histoplasmosis	14
• Examen directo, cultivo e identificación	14
• Detección de ADN de <i>H. capsulatum</i> en materiales clínicos	16
• Detección de antígeno	19
• Detección de anticuerpos	20
Genotipificación	21
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Microorganismos.....	28
Identificación fenotípica de los aislados	28
• Características macroscópicas de la fase M	28
• Características microscópicas de la fase M.....	29
• Conversión de la Fase Micelial (M) a Levaduriforme (L)	29
• Producción de exoantígeno.....	29
Genotipificación de cepas y aislados.....	30
• Extracción del ADN	30
• Purificación del ADN.....	31
• Determinación de la concentración de ADN.....	31
• RAPD-PCR	32
• Análisis de los perfiles RAPD-PCR.....	32
• Secuenciación de genes <i>Arf</i> , <i>H-Anti</i> , <i>Ole</i> y <i>Tub</i>	32
• Análisis de secuencias	34
RESULTADOS	36
Microorganismos.....	36
Identificación fenotípica de los aislados	38
• Características macroscópicas de la fase M.....	38

- Características microscópicas de la fase M..... 39
- Conversión de la Fase Micelial (M) a Levaduriforme (L) y Producción de exoantígeno . 41
- Genotipificación de cepas y aislados..... 42
- Determinación de la concentración de ADN..... 42
- RAPD-PCR 43
- Análisis de perfiles RAPD-PCR 45
- Secuenciación génica 47
- Análisis de secuencias 47
- DISCUSIÓN..... 56
- CONCLUSIONES 61
- BIBLIOGRAFÍA..... 62

AGRADECIMIENTOS

A Cristina por el apoyo, la paciencia, las enseñanzas y conocimientos transmitidos, y por todo el tiempo dedicado.

A los “profundos” de ayer y hoy: Ceci, Willy, Cristinita, Adriana, Damián y Flavia, que me enseñaron, acompañaron y ayudaron cada día en mi trabajo, e hicieron más fáciles y gratos mis días.

A Graciela por la fuerza y el empuje que me transmitía día a día para finalizar este proyecto.

A Ale, Hernán, Nico, Marian, Euge, Guille, Nadia, Susana, el Negro, Rober, Constanza, Walter, Julián, Javi, Ángela, Wanda, Omar, Claudia y Mabel mis compañeros y muchos de ellos amigos de Micología, que hicieron mis días más alegres.

A mis amigas de maestría, Cinthia y Graciana, por el año de cursada compartido y mucho más.

A la gente de los distintos laboratorios del “Malbrán” que solidariamente colaboran en las tareas diarias, haciendo el trabajo posible y más fácil.

A mis nuevos compañeros del INE que durante estos últimos meses me alentaron a escribir, Osvaldo, Flor, Ale, Andrea, Nadia y los demás compañeros del laboratorio.

A mi mamá y mi papá que siempre están, no importa donde este yo; a mis hermanos que siempre me acompañan.

A Feli, Inés y Luis por completarme.

INTRODUCCION

Histoplasma capsulatum es el agente causal de la histoplasmosis, una micosis endémica en ciertas áreas geográficas de América del Norte, América Central y América del Sur, África y Asia. A partir de 1987 la histoplasmosis es considerada una enfermedad marcador del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y en regiones de alta endemicidad la histoplasmosis diseminada es una de las principales causas de muerte de los pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) [Nacher 2013].

Histoplasma capsulatum

Histoplasma capsulatum es un hongo termodimórfico. Su forma filamentosa multicelular (fase micelial - M) desarrolla a 25-28 °C en la naturaleza e *in vitro*, mientras que su forma unicelular (fase levaduriforme - L) crece a 37 °C tanto *in vivo* (tejidos del hospedero) como *in vitro*.

El hábitat de este hongo en la naturaleza está relacionado con suelos ricos en materia orgánica, con alto contenido en nitrógeno, fosfatos e hidratos de carbono. Su crecimiento también es favorecido por la presencia de cationes divalentes como el calcio y el magnesio, los que inhiben el desarrollo de microorganismos competidores [Mahvi 1970, Taylor 1999 y 2000]. Estas condiciones se presentan en cavernas y otros huecos u orificios donde habitan aves y murciélagos, en gallineros, palomares y construcciones deshabitadas. El hombre y muchas especies de animales mamíferos se infectan por la inhalación de microconidios y pequeños fragmentos de hifas aerosolizados en ese tipo de ambientes [Huhn 2005, Kwon-Chung 1992, Pedroza-Seres 1994, Taylor 1996, 1997 y 2000].

Se conocen tres variedades taxonómicas de *H. capsulatum*, que difieren en algunas características fenotípicas y genotípicas, en el nicho ecológico y su distribución geográfica, y en las características de los hospederos susceptibles y las manifestaciones clínicas. *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, endémico de África, es el agente causal de la histoplasmosis africana, se caracteriza por el tamaño de las levaduras (alrededor de 10 µm de diámetro), que duplica al de la var. *capsulatum*, produce infección en humanos y más raramente en animales. La histoplasmosis africana presenta lesiones cutáneas, subcutáneas y óseas. *Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum*, endémico de Asia y África, es el agente causal de la linfangitis equina. Se caracteriza por presentar lesiones subcutáneas y ulcerosas en la piel de caballos y mulas. Por último, *Histoplasma capsulatum*. var. *capsulatum* es el agente de la “**histoplasmosis capsulati**”, enfermedad endémica en toda América, que también

ha causado casos en el hombre y otros mamíferos en el resto del mundo, entre los paralelos 57° Norte y 38° Sur [Burek-Huntington 2014, Calanni 2013]. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii* son indistinguibles en su fase micelial. La histoplasmosis humana puede ser causada por dos de las tres variedades descritas: *H. capsulatum* var. *capsulatum* y *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*.

In vitro, *H. capsulatum* var. *capsulatum* desarrolla a 25-28 °C formando colonias de crecimiento lento, con morfología algodonosa, color blanco o pardo y reverso incoloro, amarillo o anaranjado parduzco. Al examen microscópico presenta hifas hialinas delgadas de 1,2-1,5 µm, ramificadas y tabicadas, numerosos macroconidios de 8-14 µm de diámetro, esféricos y más raramente piriformes, de paredes lisas o verrugosas, microconidios de 1-4 x 2-6 µm redondos o piriformes, de paredes lisas o equinuladas. Ambos tipos de conidios nacen sobre conidióforos simples [de Hoog 2000, Kwon-Chung 1992]. En un estudio de aislamientos humanos, animales y ambientales de diversos países americanos, Berliner [Berliner 1968] clasificó las colonias de la fase saprofitica por sus características macro y microscópicas en dos tipos: albinas (A) y pardas (B). Las colonias de tipo A son color blanco, ásperas, con micelio aéreo, abundantes macroconidias sin proyecciones y microconidias lisas o espinosas. Las colonias de tipo B son de color tostado claro a marrón, con micelio aéreo escaso y chato, abundantes macroconidias con proyecciones y escasas microconidias. Esta clasificación morfológica aún sigue vigente, sin embargo han sido descritas numerosas variantes morfológicas de *H. capsulatum*, colonias con pigmento rojo o rosado, colonias sin microconidias y/o macroconidias, aislamientos sin conversión *in vitro* de la fase micelial a la fase levaduriforme; la mayoría de estas variantes han estado asociadas a enfermedad. [Lacaz 1999, Morris 1986, Staib 1996, Sutton 1997, Zuiani 2006].

Historia de la histoplasmosis

El primer caso de histoplasmosis fue descrito por Samuel Taylor Darling en 1904 en Panamá [Darling 1906]. El paciente de 27 años de edad, de raza negra, era un trabajador en la construcción del canal de Panamá, oriundo de Martinica que presentó una histoplasmosis diseminada fulminante. Las lesiones observadas en los órganos autopsiados del paciente semejaban una tuberculosis miliar, pero al microscopio se observaban estructuras intracelulares oviformes o circulares rodeadas de un halo que no se teñía. Darling inicialmente pensó en una *Leishmania* pero al no presentar kinetoplasto, concluyó que estaba frente a un nuevo microorganismo al que llamó *Histoplasma capsulata*. En 1912, un estudiante brasileño, Henrique Da Rocha-Lima, concluyó que la histoplasmosis era una micosis y no una enfermedad por protozooario [Kwon-Chung 1992].

Desde los años 40 se vienen realizando diversos estudios epidemiológicos con pruebas de intradermorreacción para delinear las áreas endémicas de la histoplasmosis [Mahvi 1970] y establecer una relación con el hábitat natural del hongo, determinando su presencia en el ambiente (suelo, aves). Se han descrito casos de histoplasmosis en todos los continentes, con zonas de alta y baja endemicidad. La mayoría de las infecciones en individuos inmunocompetentes son asintomáticas y autolimitadas, con baja morbilidad y mortalidad. Sin embargo, en individuos inmunocomprometidos pasan a ser importantes, sobre todo cuando existe una deficiencia en la inmunidad celular. Una revisión realizada por Wheat *et al.* en 1995 informó que la histoplasmosis ocurre en el 2-5 % de los pacientes con SIDA en áreas endémicas. En los pacientes VIH positivo el 95 % de los casos de histoplasmosis es diseminada, y el 90 % son pacientes con un recuento de linfocitos CD4+ por debajo de los 200/mm³. Un cuadro respiratorio se presenta en el 50 % de los casos probablemente asociado con hepatoesplenomegalia (25 % de los casos) y/o adenopatías (25 % de los casos). Las manifestaciones digestivas, neurológicas o mucocutáneas son menos frecuentes, alrededor del 10-20 % de los casos [Wheat 1995].

La histoplasmosis es considerada una enfermedad marcadora de SIDA desde 1987. En las últimas décadas hubo un incremento de la enfermedad asociada a pacientes inmunocomprometidos; probablemente la utilización de nuevas metodologías de diagnóstico así como la capacitación del personal en los laboratorios aumentó el número de casos confirmados de la enfermedad [Adenis 2014]. Nacher *et al.* [Nacher 2011], en un estudio realizado en Guayana Francesa, describen las principales enfermedades marcadoras de SIDA antes y después de la instauración de la terapia anti retroviral, TARGA (HAART por sus siglas en inglés), y la infección oportunista más frecuente pos-terapia resultó ser la histoplasmosis diseminada, seguida por candidiasis esofágica, toxoplasmosis cerebral y tuberculosis. Por esta razón, los autores hacen hincapié en la importancia del rápido y correcto diagnóstico por parte del laboratorio. En un reciente estudio realizado por el mismo grupo de investigadores [Nacher 2014], la incidencia de la histoplasmosis pos-TARGA resultó ser 1,5 casos/100 personas-año, y la tasa de mortalidad por histoplasmosis diseminada mayor al 30 %; lo que indicaría que cada 100.000 pacientes VIH positivo, habría 1.500 casos de histoplasmosis y 600 muertes/año en Guayana. En estudios realizados en Estados Unidos [Marukutira 2014] reportaron a la histoplasmosis como la tercera infección fúngica invasora asociada a VIH.

El aumento en el registro de histoplasmosis desde la aparición del SIDA ayudó a identificar áreas endémicas previamente no reconocidas. Aún hoy siguen apareciendo casos autóctonos en zonas geográficas supuestamente no endémicas, lo que indicaría que la

distribución mundial de la histoplasmosis es un dato aun incompleto [Bahr 2015].

Actualmente, se han documentado brotes (formas pulmonares agudas) de histoplasmosis, en diversos países de América: Canadá [Anderson 2006, CDC 2014], Estados Unidos [Benedict 2016], México [Morgan 2003, Taylor 2005a], Centroamérica [CDC 2008, Lyon 2004, Weinberg 2003], Ecuador [Wolff 1999], Venezuela [Martínez-Mendez 2013], Colombia [Jimenez 2002], Brasil [Passos 2015, Rocha-Silva 2013] y Argentina [Calanni 2013, Negroni 2010]; como así también en Asia [Ohno 2010], y África (Uganda) [Cottle 2013].

Recientemente, Benedict & Mody [Benedict 2016] realizaron una revisión de los brotes ocurridos en Estados Unidos entre 1938 y el 2013, y describen como fuente de exposición en la mayoría de los brotes las heces de murciélagos o aves, y las remociones o demoliciones de edificios o estructuras abandonadas. La presencia de murciélagos o sus heces se describió en el 23 % de los casos, y la presencia de aves o sus heces en el 56 %. Además, informaron que el 33 % de los brotes fue por exposición laboral, de estos, el 43 % ocurrió en edificios y el 17 % en lugares abiertos (construcciones en puentes y torres de agua). En el 69 % de los brotes pudieron recuperar el hongo de las muestras ambientales. La continua aparición de brotes de histoplasmosis demuestra la necesidad de reducir las exposiciones en los lugares con alta carga de heces de aves y murciélagos y las exposiciones laborales sobre todo en el rubro de la construcción. El aumento de los viajes y el uso de medicamentos inmunosupresores pueden conducir a la aparición de la infección en áreas que no se sabían endémicas.

Manifestaciones Clínicas

El hongo es adquirido por el hombre por inhalación de los microconidios o pequeños fragmentos de hifas. Una vez inhalado, en el hospedero el hongo se transforma a su fase levaduriforme. La primoinfección pasa en la mayoría de los casos desapercibida o como un resfrío leve que no es reconocido como histoplasmosis. Menos del 1 % de las personas infectadas con *H. capsulatum* presentan síntomas. La progresión de infección a enfermedad depende del estado inmune del hospedero [Kwon-Chung 1992].

El espectro de formas clínicas de la enfermedad ha sido sujeto de distintas propuestas de clasificación. En 2007, Kauffman *et al.* [Kauffman 2007] publicó una actualización sobre histoplasmosis en la que la clasifica en histoplasmosis pulmonar e histoplasmosis diseminada, y para cada una de ellas describe diferentes formas clínicas.

Cuando los individuos se exponen a concentraciones masivas de elementos infecciosos pueden desarrollar una infección respiratoria aguda denominada histoplasmosis pulmonar primaria aguda, que se presenta con fiebre, dolor de cabeza, tos no productiva, debilidad y

mal estado general. En el 5 % de los pacientes se presenta además con manifestaciones reumatológicas y/o dermatológicas (eritema nodoso y eritema multiforme, respectivamente). En los pacientes con alteraciones y/o deficiencias en la inmunidad mediada por células, la infección progresa más rápido y se vuelve multilobular, con disnea marcada e infiltrados pulmonares. Estos pacientes deben ser tratados con antifúngicos por el compromiso respiratorio que presentan.

Otra forma de presentación es la histoplasmosis pulmonar crónica, clínicamente indistinguible de la tuberculosis avanzada del adulto, enfermedad a la que puede asociarse. También puede coexistir con otras enfermedades respiratorias crónicas.

La histoplasmosis pulmonar primaria o aguda puede derivar a formas diseminadas que comprometen seriamente la vida del paciente. La forma diseminada aguda o subaguda, sea a consecuencia de infección reciente o de reactivación endógena, se manifiesta comúnmente en pacientes con inmunocompromiso severo. La forma diseminada crónica es de evolución lenta, y si no es tratada a tiempo, puede producir lesiones irreversibles e incluso llevar a la muerte del individuo. En algunos pacientes se pueden ver síntomas de la diseminación de la enfermedad, y en otros, la única manifestación es una lesión localizada. Los signos y síntomas más comunes son fiebre, malestar, anorexia con pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatías, lesiones granulomatosas localizadas comúnmente en piel, mucosas y parénquima pulmonar.

En individuos infectados, el microorganismo puede permanecer en estado de latencia, y la enfermedad producirse por una reactivación de la infección asociada a una disminución de la inmunidad. Esta es la causa por la que, personas que alguna vez habitaron y/o visitaron áreas endémicas pueden presentar histoplasmosis mucho tiempo después de la primo exposición y en países donde la enfermedad no es endémica.

Epidemiología de la histoplasmosis en Argentina

En Argentina la infección por *H. capsulatum* está muy difundida, de acuerdo a los porcentajes publicados de individuos reactivos a la histoplasmina, que varían en el intervalo de 5-78 %, según el grupo etario y la región geográfica [Mangiaterra 1996, Masih 1987, Rubinstein 1981, van Gelderen de Komaid 1992 y 1999]. Se estima que existen aproximadamente ocho millones de individuos infectados por *H. capsulatum* en todo el país. La primera observación de la enfermedad en Sudamérica fue publicada en Buenos Aires, en 1941 [Rubinstein 1981]. Hasta la emergencia del SIDA, la forma predominante en la zona del Río de la Plata era la histoplasmosis diseminada crónica, localizada comúnmente en piel y

mucosas orofaríngeas. Esta forma aún se presenta en pacientes mayores de 45 años sin deterioro grave del sistema inmune. En este tipo de pacientes es la segunda micosis endémica en frecuencia después de la paracoccidioidomicosis [Canteros 2004].

A partir del primer caso asociado a SIDA en nuestro país descrito en 1983 [Negroni 1990], la incidencia de la histoplasmosis en pacientes con inmunocompromiso grave aumentó drásticamente [Negroni 1994]. Se comenzó a detectar un mayor número de casos de histoplasmosis, y el índice de prevalencia de la enfermedad fue estimado entre 0.5-1.0 por cada 1000 personas infectadas [Bava 1995]. En pacientes con inmunocompromiso el microorganismo actúa como oportunista, produciendo una histoplasmosis diseminada aguda o subaguda. En un hospital de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Negroni *et al.* [Negroni 1994] encontraron este tipo de lesiones en 42 de 53 casos de histoplasmosis asociada a SIDA, diagnosticados entre 1983 y 1992. En 2004, en un hospital del interior del país, Pietrobon *et al.* [Pietrobon 2004] describieron lesiones mucocutáneas en una alta proporción de pacientes con histoplasmosis y SIDA. En ese mismo año se realizó una encuesta nacional sobre las micosis diagnosticadas, en la que resultó que el 7 % fueron micosis profundas y de estas, casi el 60 % fueron causadas por *H. capsulatum*, apareciendo la histoplasmosis como la más frecuente [Davel 2007].

En Argentina, los brotes epidémicos tienen baja prevalencia [Rubinstein 1981]. Existen registros de dos brotes ocurridos en nuestro país, uno en la localidad de Morón, Provincia de Buenos Aires [Negroni 2010] y otro en Zapala, Provincia de Neuquén [Calanni 2013].

La histoplasmosis localizada en el sistema nervioso central (SNC) tiene incidencia descrita del 5-10 % en pacientes con forma diseminada, y es muy poco frecuente en individuos inmunocompetentes. Si bien en Argentina las presentaciones clínicas más frecuentes son las mucocutáneas y las pulmonares, recientemente, se han detectado una serie de casos de meningoencefalitis por *H. capsulatum* en pacientes sin ningún tipo de inmunosupresión ni enfermedad predisponente previa, la mayoría oriundos de una área geográfica localizada en el noroeste argentino [Esteban 2016, Ibarra-Camou 2015]

Diagnóstico de la histoplasmosis

- Examen directo, cultivo e identificación

El diagnóstico presuntivo se realiza a través del examen microscópico de preparados previa coloración de Giemsa; esta coloración permite observar las levaduras intracelulares de *H. capsulatum*. La observación microscópica requiere de un observador experimentado y depende de una adecuada toma de muestra del espécimen a analizar. Además, otras especies

fúngicas como *C. glabrata* [Lamps 2000] y *Sporothrix spp.* [Martagon-Villamil 2003] pueden confundirse con *H. capsulatum* en los materiales clínicos.

El diagnóstico definitivo de histoplasmosis requiere el desarrollo y la identificación del agente causal en cultivo a 25-28 °C (fase micelial) y/o 35-37 °C (fase levaduriforme). El cultivo a 25-28°C se caracteriza macroscópicamente por formar dos tipos de colonias denominadas A (albinas) y B (Brown) [Berliner 1968]. Microscópicamente se puede observar en los aislamientos típicos un micelio tabicado, hialino muy delgado con presencia de macroconidios de 12 a 15 µm de diámetro con prolongaciones digitiformes, mientras que los microconidios pueden estar presentes o ausentes. A 35-37°C desarrollan colonias levaduriformes que se caracterizan macroscópicamente por ser rugosas, de bordes irregulares y sin pigmentación y microscópicamente son pequeñas de 2-5 µm con o sin brotes.

Además de la morfología microscópica de los cultivos, la termoconversión de fase micelial a levaduriforme ó viceversa y la detección de exoantígenos H y/o M son pruebas complementarias que completan la identificación de especie [Kauffman 2007]. El desarrollo de conidios en la fase micelial, requiere de 2 a 4 semanas de desarrollo (media 20 días). La conversión de fase micelial a levaduriforme es laboriosa y no siempre exitosa, en algunos casos es parcial o nunca ocurre. Por su parte, la detección de exoantígenos requiere entre 4 semanas y hasta 3 meses. [Kwon-Chung 1992]. Actualmente, el hallazgo cada vez más frecuente de aislamientos aberrantes, [Morris 1986, Sutton 1997, Zuiani 2006], la falla en la termoconversión [Lacaz 1999, Sandin 1993] y la producción lenta de exoantígenos aumenta la dificultad en el diagnóstico de la histoplasmosis. Además, hongos miceliales como *Sepedonium sp.*, *Chrysosporium sp.*, *Corynascus sp.* y *Renispora sp.*, pueden producir macroconidios tuberculados que recuerdan la micromorfología de *H. capsulatum* en su fase M. Todo esto llevó a desarrollar métodos alternativos basados en técnicas moleculares para la identificación de *H. capsulatum*. [Beguin 2005, Gaur 1980, Guedes 2003, Ibarra Camou 2011, Kauffman 2007].

El rápido diagnóstico de la enfermedad permite la instauración de una terapia adecuada y una mejor expectativa en la cura de la histoplasmosis.

El primer avance importante en la identificación molecular de *H. capsulatum* de cultivos fue el AccuProbe Histoplasma (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA) [Hall 1992]. Este método utiliza una sonda de ADN específica para ARN ribosomal de *H. capsulatum*. La sonda está marcada con un éster de acridina quimioluminiscente que, al ser hidrolizado, emite luz que puede ser medida por el luminómetro Leader I (Gen-Probe). La emisión se registra como unidades

relativas de luz (RLU). Esta técnica está aún vigente, es fácil de realizar, requiere un mínimo inóculo y poco tiempo de realización [Chemaly 2001, Huffnagle 1993, Padhye 1992, Sandin 1993]; sin embargo, algunos autores observaron reacciones falso positivas con especies de *Chrysosporium* sp. [Brandt 2005] y *Aspergillus* sp. [Hall 1992]. Un cultivo de *Nocardia brasiliensis* mostró falso resultado positivo, lo que pudo haber sido ocasionado por el medio de cultivo adicionado con 10 % de sangre de carnero [Stockman 1993]; no siempre la presencia de sangre genera falsos positivos pero debe ser tomada en cuenta ante resultados incongruentes. Además, la sonda quimioluminiscente, posee una baja vida media (6 meses) y el instrumental necesario para la lectura de la reacción tiene un costo elevado [Huffnagle 1993].

Recientemente, Furuie *et al.* [Furuie 2016] propusieron un método alternativo de identificación de *H. capsulatum* utilizando la técnica de “rolling circle amplification” (RCA) con “sondas candado”, que consiste en una amplificación isotérmica del ADN, resistente a la contaminación y requiere poca o ninguna optimización de ensayo. Los autores diseñaron dos sondas basadas en la región ITS del ADNr del hongo, una de las sondas, la HcPL2, mostró ser específica para todos los aislamientos de *H. capsulatum* (incluidas las cepas de referencia) y no amplificó los controles negativos demostrando ser útil para la identificación rápida de *H. capsulatum*.

- Detección de ADN de *H. capsulatum* en materiales clínicos

Las técnicas de PCR es la prueba molecular más utilizada para detectar ADN fúngico en las muestras clínicas. Estas técnicas reducen notablemente el tiempo de diagnóstico, lo que se traduce en una mejora en la sobrevivencia de los pacientes con histoplasmosis por la rápida implementación de las terapias adecuadas. Además, la disminución del riesgo biológico para el personal de laboratorio, permite ampliar la cobertura diagnóstica de la enfermedad e implementarla en centros donde las condiciones de bioseguridad no permiten trabajar con aislamientos de *H. capsulatum*. Estas técnicas ofrecen grandes perspectivas desde el punto de vista clínico y se posicionan como una técnica complementaria al examen directo, al cultivo y la serología, sobre todo en pacientes infectados con el VIH y con otro tipo de inmunodeficiencias que hacen arduo el reto diagnóstico [Guimarães 2006, Muñoz C. 2010, Simon 2010, Toranzo 2009].

En los últimos años se propusieron varias técnicas para detectar ADN de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas, la mayoría basadas en PCR convencional, anidada, semianidada y en tiempo real. Los primeros estudios fueron realizados utilizando PCR anidada con los

primers diseñados para una región específica del ADN de *H. capsulatum* que codifica para la proteína coactivadora de 100 kDa (gen HcP 100), y para el gen que codifica la región 18S del RNA ribosomal [Bialek 2001 y 2002]. Ambas reacciones fueron ensayadas utilizando muestras de biopsias incluídas en parafina; de éstas, la PCR que amplificaba el gen Hcp100 fue la más específica (100 % de especificidad sin necesidad de secuenciación) para el diagnóstico rápido. El límite de detección de *H. capsulatum* en ambos ensayos fue de 1 a 5 células fúngicas, lo que fuera confirmado posteriormente por otros autores [Muñoz C. 2010, Toranzo 2009].

En 2003, Bracca *et al.* [Bracca 2003] desarrollaron una PCR semi-anidada utilizando primers que amplifica una región del gen que codificaba para el antígeno H de *H. capsulatum*. Este ensayo demostró ser sensible y específico, con la capacidad de detectar material genético correspondiente a menos de 10 levaduras y no presentó reacción cruzada con otros patógenos bacterianos o fúngicos. Ese mismo año, Martagon-Villamil *et al.* [Martagon-Villamil 2003], desarrollaron y evaluaron una PCR en tiempo real basada en la región ITS y la probaron sobre muestras respiratorias (lavado bronqueo alveolar y biopsia de pulmón).

Maubon *et al.* [Maubon 2007] evaluaron 40 muestras provenientes de 21 casos de histoplasmosis diseminada diagnosticados en Cayena, Guayana Francesa. La prueba demostró sensibilidad y especificidad del 100 %, confirmando su potencial en el diagnóstico rápido de la histoplasmosis. Muñoz *et al.* [Muñoz C. 2010] validaron la utilización del marcador HcP100 para el diagnóstico de la histoplasmosis, analizando 146 muestras clínicas provenientes de 135 pacientes colombianos con sospecha de sufrir la micosis. Solo el 45,9 % de las muestras fueron positivas por cultivo y PCR; sin embargo, la PCR detectó 9 casos más con cultivos negativos, con un valor predictivo positivo de 83 % y un valor predictivo negativo de 100 %. Adicionalmente, en este estudio de validación e implementación de la PCR anidada, los investigadores determinaron la especificidad de la técnica evaluando muestras de individuos sanos, muestras respiratorias de pacientes con sospecha de otras micosis con cultivos negativos, muestras de pacientes con otras infecciones probadas y con ADN extraído de cultivos de diferentes microorganismos, con una sensibilidad del 100 % y especificidades de 92,4 y 95,2 %. El éxito del marcador HcP100 para el diagnóstico de histoplasmosis fue corroborado en estudios de infección natural por *H. capsulatum* en animales [Espinosa-Avilés 2008, Reyes-Montes 2009].

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio evaluamos la utilidad del marcador HcP 100 en muestras de sangre total utilizando un método “in house” para la extracción del ADN fúngico, alcanzando valores de sensibilidad de 89 % y de especificidad de 96 % para el

diagnóstico de la micosis [Toranzo 2009].

Ohno *et al.* [Ohno 2013] evaluaron una PCR anidada que amplifica un fragmento del gen que codifica al antígeno M de *H. capsulatum*; de cinco casos con histoplasmosis confirmada la PCR fue capaz de detectar cuatro a diferencia del cultivo que solo fue capaz de detectar un caso y de la serología que detectó tres casos.

Frias de León *et al.* [Frias de Leon 2012] desarrollaron dos marcadores SCAR a partir de una banda de amplificación de 1200 pb, común a todos los aislamientos de *H. capsulatum* por RAPD-PCR con los primers 1281-1283. Los marcadores denominados 1281-1283 (220) y 1281/83 (230) fueron probados con una PCR convencional de un paso con 36 muestras clínicas (17 humanas, 19 de animales, 9 de infección experimental y 10 de infección natural) y 20 muestras ambientales (10 de suelo y 10 de guano). Aunque ambos marcadores pudieron detectar 0,001 ng de ADN de *H. capsulatum*, el marcador SCAR 1281-1283 (220) fue el más específico. En 2012 este marcador fue evaluado en un estudio multicéntrico frente a un panel de diferentes concentraciones de ADN, con baja sensibilidad (43 %) y especificidad del 100 % [Buitrago 2013].

Buitrago *et al.* [Buitrago 2006] desarrollaron una PCR en tiempo real para detectar *H. capsulatum* utilizando oligonucleótidos diseñados con base en la región ITS1 del ARNr. La prueba fue evaluada en muestras de suero de pacientes infectados por el VIH con histoplasmosis probada. Esta prueba fue reproducible y específica con 70 % de sensibilidad y 100 % de especificidad; y con un límite de detección de 1 fg/ μ L. En un nuevo trabajo, estos autores [Buitrago 2007] valoraron la PCR en tiempo real utilizando otros especímenes clínicos y demostraron una mayor eficiencia en el diagnóstico cuando utilizaron muestras de secreciones respiratorias y de médula ósea, no así en suero donde la sensibilidad fue baja. Los autores concluyeron que la técnica es específica y sensible para el diagnóstico precoz de la histoplasmosis, y que adicionalmente es útil para el diagnóstico de la micosis en pacientes infectados con el VIH, en los que la detección de anticuerpos por inmunodifusión fue negativa.

El estudio realizado en Guayana Francesa comparó la eficiencia del cultivo *versus* una técnica de PCR en tiempo real en 348 muestras clínicas de pacientes con sospecha de micosis profundas. La PCR en tiempo real resultó 95,4 % sensible y 96,0 % específica; en 7 muestras se observó inhibición de la amplificación. Los autores señalaron que una de las mayores ventajas fue la considerable disminución en el tiempo de diagnóstico comparado con las técnicas microbiológicas clásicas [Simon 2010]. Por su parte Balajee *et al.* [Balajee 2013] trabajaron sobre muestras parafinadas y realizaron una PCR con posterior secuenciación de parte de la

región ITS amplificada.

Schell *et al.* [Scheel 2014] desarrollaron un método para la detección de histoplasmosis diseminada que pueda realizarse en laboratorios de bajos recursos. La técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP del inglés *loop-mediated isothermal amplification*) amplifica ADN con una polimerasa con actividad de helicasa (proveniente del *Bacillus stearothermophilus*, *Taq-Bst*) que trabaja a una temperatura constante, razón por la cual no necesita un termociclador sino que la reacción se puede realizar en un baño térmico o bloque seco. Las principales ventajas son sencillez en la ejecución, rapidez, alta sensibilidad y especificidad. Además, el sistema permite la discriminación visual de resultados y la presencia de inhibidores de PCR tienen poco impacto en la reacción debido a que la *Taq Bst* es resistente a los componentes de los medios de cultivo y las sustancias biológicas. Los estudios realizados en la detección de ADN de *H. capsulatum* utilizaron como blanco el gen Hcp100, y se analizaron muestras de orina de pacientes VIH positivo con histoplasmosis diseminada comprobada. El límite de detección de la técnica fue de 10 fg/l a 1 pg/l (1 a 30 genomas por reacción) de *H. capsulatum* con una mediana de 6 genomas. El límite de detección de LAMP Hcp100 comparado con la PCR tradicional Hcp100 fue 10 veces más bajo. La especificidad, probada frente a ADN de otras levaduras y hongos clínicamente relevantes, así como también de ADN humano y de micobacterias, fue de 100 %. El ensayo LAMP detectó ADN de *H. capsulatum* en el 67 % (4/6) de las muestras de orina de pacientes con reacción positiva para el antígeno urinario; tres de ellas en el sedimento y el sobrenadante, y otra solo en el sedimento. Ninguna de las 6 muestras dio positiva la PCR anidada tradicional [Bialek 2002].

- Detección de antígeno

La detección de antígeno de *H. capsulatum* resultó ser útil no solo para el diagnóstico de la micosis, sino también para realizar el seguimiento en los tratamientos. Los primeros métodos para la detección de antígenos se realizaron en 1986 utilizando la técnica de enzaimunoensayo. Luego, en 1997, esta técnica se adaptó para su utilización en muestras de orina y suero. Los autores ponderan la técnica por su rapidez en comparación al cultivo y a la detección de anticuerpos. Sin embargo, existen pocos equipos comerciales disponibles para detectar antígenos de *H. capsulatum*, y existen métodos caseros que discrepan en sensibilidad y especificidad dependiendo de la técnica (radioinmuno ensayo en fase sólida-RIA- o un enzimoimmuno ensayo tipo sándwich-EIA), la muestra clínica, el anticuerpo utilizado y la población analizada, entre otras razones [Fandiño-Debia 2016].

La detección de antígeno es un método útil en los casos en los que la carga del

microrganismo es muy alta, como ocurre en los pacientes con SIDA que tienen histoplasmosis diseminada; y la cuantificación del antígeno permite monitorear la respuesta al tratamiento. El inconveniente de la técnica es que presenta falsos positivos con otras micosis y con algunos tratamientos [Wheat 1997].

Entre los métodos disponibles actualmente para la detección de antígeno de *H. capsulatum*, el EIA cuantitativo ofrecido por el laboratorio de diagnóstico Miravista (Mvista EIA Hc, Indianápolis), tiene alta sensibilidad para diagnosticar histoplasmosis agudas y sistémicas con valores de 75 a 80 % y >90 %, respectivamente [Hage 2011]. Sin embargo el principal inconveniente de este método es que requiere que la muestra clínica sea remitida al laboratorio prestador del servicio. El primer equipo que se comercializó para la detección de antígeno urinario de *Histoplasma* utilizando la técnica de EIA fue el Alfa Histoplasma antígeno EIA (IMMY, Norman, OK), con baja concordancia positiva respecto al Mvista EIA Hc. Recientemente, un segundo equipo comercial para la detección de *Histoplasma* galactomanano (GM) por la técnica de EIA fue desarrollado por IMMY. El reactivo mostró una concordancia de 90 % respecto a los resultados de Mvista, y no presentó falsos positivos [Theel 2015].

- Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos en circulación es un método útil para el diagnóstico de formas crónicas de histoplasmosis. Los ensayos que se utilizan para detectar anticuerpos son fijación de complemento (FC) o inmunodifusión (ID). La FC presenta reacción cruzada con otros hongos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides* spp. y *Aspergillus* spp.) y con procesos granulomatosos (tuberculosis y sarcoidosis) [Wheat 1986]. La técnica de ID permite detectar la presencia de las bandas de precipitación H y M, y realizar una semicuantificación de la concentración de anticuerpos. La banda M aparece en las formas agudas de la infección, está presente en las formas crónicas y puede persistir por varios años después de resuelta la enfermedad. La banda H es menos común y es indicativa de una forma crónica o aguda severa, raramente se la encuentra sin la banda M. La ID tiene una sensibilidad del 90 % aproximadamente y una especificidad mucho mayor a FC; la sensibilidad se puede aumentar realizando conjuntamente ID con contrainmunolectroforesis (CIEF). [Bauman 1976, Picardi 1976] La detección de anticuerpos es útil en los pacientes con formas crónicas de la enfermedad los cuales han tenido tiempo de desarrollar anticuerpos, y en los casos de infección aguda porque permite titular e ir pronosticando la evolución de la enfermedad; es menos sensible en los pacientes inmunocomprometidos VIH positivo, el 50-70 % dan serología

positiva. Se necesitan de 2 a 6 semanas post-exposición al agente para que se produzcan anticuerpos [Kauffman 2007, Wheat 1995].

También se han desarrollado pruebas de Western Blot (WB) para detectar la presencia de anticuerpos en suero contra antígenos glicosilados y químicamente desglicosilados de las bandas M y H de *H. capsulatum* obtenido de los pacientes durante la fase aguda de histoplasmosis pulmonar. Pizzini *et al.*, demostraron mejores valores de sensibilidad y especificidad para los antígenos desglicosilados por tratamiento con NaIO₄ (ptHMIN, precipitinas anti-histoplasmina), con valores de sensibilidad de 90 y 100 % para la fases aguda y convaleciente respectivamente, y 100 % de especificidad en ambas fases [Pizzini 1999]. Este mismo grupo de investigadores recientemente validó el WB utilizando 118 muestras de suero de pacientes con histoplasmosis y 118 controles sanos, todos de residentes del Estado de Río de Janeiro, Brasil. La prueba WB mostró una sensibilidad del 94,9 %, una especificidad del 94,1 %, valor predictivo positivo de 94,1 %, valor predictivo negativo de 94,9 % y una precisión del 94,5 %. Además, las tiras han demostrado ser viables para su uso después de al menos 5 años de la sensibilización de antígeno ptHMIN [Almeida 2016].

Richer *et al.* [Richer 2016] compararon los métodos de detección clásica de anticuerpos anti-Histoplasma (ID y FC) con el EIA MVista *Histoplasma* anticuerpo, que detecta separadamente anticuerpos IgG e IgM, y con EIA MVista *Histoplasma* antígeno en pacientes con histoplasmosis pulmonar aguda. Se detectaron anticuerpos IgG en 87,5 %, IgM en 67,5 % e IgG y/o IgM en 88,8 % de los pacientes con histoplasmosis pulmonar aguda, mientras que por inmunodifusión, fijación de complemento y EIA-antígeno las sensibilidades fueron de 55,0 %, 73,1 % y 67,5 %, respectivamente. La combinación de EIA antígeno y EIA anticuerpos aumentó la sensibilidad a 96,3 %.

Genotipificación

La técnica de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando el ADN mitocondrial y ribosomal se convirtió en una herramienta útil tanto para determinar las relaciones taxonómicas y evolutivas de los microorganismos como para su análisis epidemiológico. Distintos autores utilizaron los patrones obtenidos por restricción para clasificar los aislamientos (humanos, ambientales y animales) de *H. capsulatum* [Keath 1989b y 1992, Spitzer 1989, Vincent 1986]. Vincent *et al.* [Vincent 1986] identificaron tres clases distintas de *H. capsulatum* en un estudio que incluía aislamientos humanos y animales de diversos orígenes geográficos, las cuales denominaron clase 1, clase 2 y clase 3. Dentro de la clase 1 estaba solo la cepa Downs, en la clase 2 los aislamientos de Norte América y los *H.*

capsulatum var. *duboisii*, y en la clase 3 los aislamientos de América Central y del Sur. En estudios posteriores, donde se utilizaron genes nucleares, *yps-3*, se propusieron 6 clases: (1) cepa Downs, (2) Norte América, (3) variedad 1 de Panamá, (4) aislamientos de suelo de Florida, (5) América Central y del Sur, y (6) variedad 2 de Panamá [Keath 1992].

Posteriormente, se desarrollaron técnicas más rápidas para la genotipificación de *H. capsulatum* utilizando diferentes variantes de la técnica de PCR.

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico por PCR (RAPD-PCR) permitió, según algunos autores, obtener patrones genéticos de los aislamientos para poder agruparlos. Estos agrupamientos pueden hacerse en base al origen geográfico del aislamiento, al tipo y/u origen de muestra de donde proviene el aislamiento (ejemplo: muestra ambiental, animal o clínica, y dentro de estas últimas: sangre, muestras respiratorias, muestras de sistema nervioso central, etc), a la patología de base del paciente del cual fue obtenida la muestra (ejemplo: paciente con o sin VIH), e incluso determinar si varios aislamientos obtenidos de distintas muestras de un mismo paciente presentan el mismo patrón genético de bandas o varios patrones, lo que sugeriría una infección mixta causada por distintas cepas del mismo patógeno [Muniz 2001, Perrota 2001, Poonwan 1998, Reyes-Montes 1999, Taylor 2000, Zancopé-Oliveira 2005]. El método RAPD-PCR es una técnica sensible, sencilla y reproducible para comparar aislamientos y realizar estudios epidemiológicos, siempre y cuando los primers utilizados sean cuidadosamente elegidos [Kersulyte 1992]. Se han publicado trabajos que utilizan diversos primers para realizar distintos agrupamientos. Poonwan *et al.* [Poonwan 1998] utilizaron los primers R1, R2 y R3 para hacer un análisis genético de un grupo de aislamientos de Tailandia y con cada uno de estos primers obtuvieron patrones de bandas que les permitieron realizar distintos agrupamientos (hasta 4 grupos). Taylor *et al.* [Reyes-Montes 1999, Taylor 2000] utilizaron los primers 1281, 1283, 1253 y 1247, de a uno o combinados entre ellos, para realizar un análisis genético de los aislamientos mexicanos. En todos los casos estos primers permitieron realizar agrupamientos según el origen geográfico, la patología de base del paciente (SIDA o no-SIDA) o el comportamiento de los animales (migratorios o no migratorios) de los cuales fueron obtenidos los aislamientos; describieron 4 grupos. En Brasil, Zancopé Oliveira *et al.* [Muniz 2001, Zancopé-Oliveira 2005], utilizaron diversos primers (1253, 1281, D9355, D10513, 2, 3, 4 y 5) y obtuvieron en los distintos trabajos agrupamientos según el origen geográfico (3 grupos: I Noreste de Brasil, II: Sudeste y Sur de Brasil, y III: Centro de Brasil) o la procedencia de la muestra (Grupo I y II: mayoritariamente muestras de suelo o animales, Grupo III y IV: muestras humanas). En Argentina, distintos autores realizaron trabajos utilizando los primers 1281 y 1281-1283 para caracterizar genotípicamente los

aislamientos obtenidos en el país, para dilucidar si los aislamientos de un brote están asociados a un genotipo autóctono o no, o bien para realizar estudios de brote [Calanni 2013, Canteros 2005a, Negroni 2010, Perrotta 2001, Zuiani 2006].

Carter *et al.* [Carter 1997] utilizaron microsatélites (regiones del genoma que tiene repeticiones cortas, de dos a cuatro nucleótidos) para el estudio de la población genética de *H. capsulatum*. Propusieron tres marcadores multialélicos que les permitieron distinguir los aislamientos a nivel individual y resultaron polimórficos tanto en las poblaciones de América del Norte como en las de América del Sur. Estos marcadores fueron utilizados posteriormente por otros autores con resultados controvertidos [Damasceno 2015]. Un estudio realizado en 2012 utilizando el microsatélite (Ga)n del gen *Hsp60* como marcador en murciélagos migratorios de México, Brasil y Argentina mostró que los genotipos de *H. capsulatum* se distribuyen de acuerdo a las rutas de migración de estos animales en las Américas y, por lo tanto, podrían utilizarse como marcadores biogeográficos [Taylor 2012].

La amplificación de una región no codificante de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ha sido ampliamente utilizada para el examen de polimorfismos interespecie de hongos patógenos humanos. Algunos estudios indican una asociación entre el perfil de la región polimórfica ITS1-5.8S-ITS2, el origen geográfico y la fuente ambiental de los aislamientos de *H. capsulatum*. [Brilhante 2012, Landaburu 2014, Tamura 2002] Muniz *et al.* [Muniz 2010] realizaron un trabajo en el que combinaron la PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 con el análisis RFLP en Brasil para distinguir aislamientos de *H. capsulatum* provenientes de distintas fuentes y regiones geográficas; y obtuvieron como resultado que los aislamientos del estado de Río de Janeiro agrupan en tres grupos principales, genéticamente distintos de otros estados brasileños, así como también de otros países de Latinoamérica. La alta similitud genética entre los aislamientos de Río de Janeiro sugeriría que solo una población genética está presente en ese microambiente. Sin embargo, este estudio pone de manifiesto la presencia de más de un genotipo para otras regiones de Brasil.

Kasuga *et al.* [Kasuga 1999], realizaron un análisis filogenético de *H. capsulatum* basado en las secuencias parciales del ADN de cuatro genes, los cuales fueron seleccionados porque presentan una variación evolutiva suficiente con apropiada confianza estadística, mientras que la región ITS, ampliamente utilizada para estudios taxonómicos y filogenéticos de hongos, no presenta el polimorfismo suficiente para resolver las variedades de *H. capsulatum*. Los genes seleccionados fueron: *Tub 1* que codifica para alfa tubulina, *Arf* que codifica para un factor de ribosilación de ADP, *Ole* que codifica para una desaturasa de ácidos grasos y *H-anti*

que codifica un precursor del antígeno H. Con base en el análisis de estas secuencias parciales describieron 8 poblaciones genéticas o clados asociados al origen geográfico del hongo, siete de los cuales fueron propuestos como especies filogenéticas diferentes. El análisis filogenético determinó que *H. capsulatum* var. *capsulatum* no es un grupo monofilético.

En 2003 Kasuga *et al.* [Kasuga 2003] ampliaron el estudio de la secuencia de múltiples locus (MLST) a 137 cepas de orígenes geográficos diversos, representando 25 países de los 6 continentes y las 3 variedades taxonómicas del hongo, destacando 6 de la var. *duboisii* y 13 de la var. *farciminosum*. Las siete especies filogenéticas que resultaron de este trabajo y que son las reconocidas al momento son: Norteamérica clase 1 (**NAm1**, anteriormente NAm *Hcc1*), Norteamérica clase 2 (**NAm2**, anteriormente NAm *Hcc2*), Latinoamérica grupo A (**LAmA**, Sam *Hcc* grupo A), Latinoamérica grupo B (**LAmB**, Sam *Hcc* grupo B), **Australia**, **Holanda-Indonesia** y **África** (*H. capsulatum* var. *duboisii*); y un clado **Eurasia** que emerge de LAmA.

En cada uno de los árboles obtenidos en el análisis filogenético de cada uno de los cuatro genes, los aislamientos tienden a agruparse de acuerdo a su origen geográfico. El clado África podría tener dos ramas filogenéticamente independientes que deberían seguir estudiándose con un mayor número de aislamientos. El clado LAmA es el que mayor diversidad filogenética presentan los aislamientos, incluye aislamientos desde Brasil hasta México y el clado Eurasia, que es un grupo monofilético homogéneo. La gran mayoría de los aislamientos de Argentina están en el clado LAmB. Los aislamientos de Latinoamérica son extremadamente ricos en polimorfismos, sin embargo, no habría recombinación genética entre los grupos LAmA y LAmB. Además, encontraron que la distancia genética entre NAm1 y NAm2 es mayor a la de cualquier otro grupo, lo que significaría que históricamente no están relacionados y que no hubo intercambio genético entre estos grupos. Todos los aislamientos del grupo NAm1 fueron aislados de pacientes con VIH, salvo el aislamiento Downs y uno ambiental del año 1940, lo que sugeriría que este grupo existe en la naturaleza, previo a la pandemia del VIH.

En 2013, Balajee *et al.* [Balajee 2013] analizaron un aislamiento y cinco muestras de tejido fijado en formol e incluidos en parafina (FFPE) de 6 casos confirmados de histoplasmosis en gatos que residían en Colorado, California y Texas, EEUU. (áreas no endémicas de *H. capsulatum*) utilizando el análisis de MLST. Los resultados indicaron que los aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de los gatos estaban más estrechamente relacionados con el clado NAm1, pero agruparon por separado, lo que sugiere que las cepas de *H. capsulatum* que infectan a los animales puede representar un clado o especie filogenética diferente.

Los estudios más recientes que analizan el MLST de 234 aislamientos, confirman que *H. capsulatum* sensu lato es un complejo de al menos 8 clados: Australia, Países Bajos, Eurasia, Nam1, Nam2, LAmA, LAmB y África; con la excepción de la agrupación de Eurasia, los clados se consideran especies filogenéticas. Estos autores además sugieren nuevas especies filogenéticas en el complejo, que comprenden LAmA1, LAmA2, LAmB1, LAmB2, RJ y BAC-1 [Teixeira 2016].

HIPÓTESIS

En la epidemiología de las enfermedades infecciosas, las técnicas moleculares son herramientas importantes para llevar a cabo investigaciones relacionadas con la detección y tipificación de los aislamientos, la identificación de las fuentes de exposición y la determinación de los diferentes genotipos asociados a la patogénesis de la enfermedad. Estudios realizados con anterioridad en Argentina sobre aislamientos clínicos y ambientales, muestran que la mayoría pertenecen a la especie filogenética LAmB que es clonal. La reciente aparición de brotes epidémicos de histoplasmosis en Argentina por debajo del paralelo 34° S, y un grupo de casos de infecciones del SNC por *H. capsulatum* provenientes de una región geográfica localizada nos hace pensar en que estos probablemente se relacionen con genotipos particulares del hongo aún no descritos en el país.

OBJETIVO GENERAL

Aportar al conocimiento de la epidemiología de la histoplasmosis en la República Argentina a través de la vigilancia de genotipos de *H. capsulatum* circulantes utilizando métodos moleculares.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar cepas y aislados de *H. capsulatum* de pacientes con histoplasmosis de diferentes regiones geográficas de Argentina y de diferentes muestras clínicas.
2. Caracterizar fenotípicamente los aislados más recientes.
3. Reconocer los clados o especies filogenéticas circulantes en nuestro país realizando la secuenciación parcial de los genes *H-ANTI* (precursor de antígeno H), *OLE* (delta-9 ácido graso desaturasa), *ARF* (factor de ADP ribosilación) y *TUB1* (alfa tubulina) y posterior análisis de MLST.
4. Caracterizar genotípicamente los aislados y cepas utilizando una técnica de RAPD-PCR (1281-1283).
5. Reconocer las relaciones entre las especies filogenéticas, el origen geográfico probable del aislamiento y el material clínico de origen.
6. Evaluar la utilidad de ambos métodos moleculares como herramientas epidemiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Las cepas de *H. capsulatum* datadas entre 2000 y 2004 fueron seleccionados de la colección de cultivos del Departamento Micología (DMic) del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Estas cepas fueron recuperadas a partir de la fase M conservada en aceite mineral a temperatura ambiente. Además, se incluyeron en el estudio aislamientos clínicos que ingresaron al laboratorio para su identificación a partir de 2006 y hasta 2010. Los aislados fueron identificados según criterios de inclusión de la colección e ingresados a la misma.

Se estudiaron en total 46 muestras de *H. capsulatum*: 15 cepas y 30 aislados clínicos procedentes de diferentes materiales clínicos y regiones geográficas de Argentina, y un aislado ambiental procedente de un brote. Se incluyó ADN de dos cepas de referencia: G186B (ATCC 26030) y Downs (ATCC 38904) que se encuentran depositadas en DMic. Se revisaron los datos de registro de la colección y las fichas de derivación de muestras para conocer si los pacientes poseían algún inmunocompromiso.

Todos los procedimientos se realizaron en estrictas condiciones de bioseguridad según el Manual de Salud, Bioseguridad y Seguridad y Medio Ambiente, Departamento Micología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (2015), y las recomendaciones del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, OMS, 3ª Edición (2005); y del Manual Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina, CDC, 5ª Edición (2009).

Identificación fenotípica de los aislados

- Características macroscópicas de la fase M

Se preparó agar Sabouraud glucosa 2 % -ASG 2 % (peptona 1 %, agar 1,5 % y glucosa 2 %), se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C a 1 atm, y se vertió 10 ml de agar por tubo de 150 x 10 mm con tapa a rosca, se dejó enfriar inclinado, formando pico de flauta. Se realizaron los controles establecidos en el procedimiento de control de calidad de medios de cultivo: (a) control de esterilidad incubando todos los tubos del lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) control de crecimiento inoculando 2 tubos tomados al azar por lote, uno se inoculó con *Candida albicans* ATCC 60193 y otro con *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 hasta observar crecimiento.

Sobre el medio de cultivo controlado se sembró un pequeño fragmento de la cepa en estudio en el centro de la superficie del agar, y se incubó en estufa a 25-28 °C. A los 20 a 30 días de crecimiento se observó el aspecto de cada colonia, por el anverso y el reverso.

- Características microscópicas de la fase M

Se disgregó el micelio con un ansa de gancho. Para ello, se tomó un trozo de aproximadamente 1 mm de la colonia que desarrolló en ASG 2 %, y se lo colocó sobre un portaobjeto que contenía una gota de lactofenol (fenol 20 g, ácido láctico 20 ml, glicerina 40 ml y agua destilada 20 ml) - azul de algodón al 2 % (LF-AA). Utilizando dos ansas (gancho y aguja) se procedió a disgregar el material fúngico, se cubrió el disgregado con un cubreobjetos y se examinó al microscopio óptico. Se registró la presencia o ausencia de macro y/o microconidios o micelio estéril.

- Conversión de la Fase Micelial (M) a Levaduriforme (L)

Para la conversión de la fase M a L, se preparó agar infusión cerebro corazón pH=7,4 (BHI por sus siglas en inglés “brain heart infusión”, Difco, Argentina) según las especificaciones del fabricante, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120°C y 1 atm y se vertió 10 ml de agar por tubo de 100 x 10 mm con tapa a rosca, se dejó enfriar inclinado de manera tal que se forme un pico de flauta. Se realizaron los controles establecidos en el procedimiento de control de calidad de medios de cultivo: (a) control de esterilidad incubando todos los tubos del lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) control de crecimiento inoculando 2 tubos tomados al azar por lote, uno se inoculó con *C. albicans* ATCC 60193 y otro con *T. mentagrophytes* ATCC 9533 hasta observar crecimiento.

Sobre el medio de cultivo controlado se inoculó cada aislado y se incubó a 35°C y 5 % de CO₂, se realizaron subcultivos cada 72 horas hasta obtener la fase L. En algunos casos, fue necesario utilizar agar MLGema (2,1 % Muller Hinton, 1 % agar, 2 % glucosa, 0,2 % L-cisteína hidroclicorada, 15 ml yema de huevo para 100 ml de medio) [Fressatti 1992] para favorecer la conversión. A este medio se le realizó control de esterilidad incubando todos los tubos del lote durante 48 h a 25-28 °C.

La conversión total de cada uno de los aislados se observó mediante un disgregado en LF-AA 2 % al microscopio óptico. Se registró la cantidad de días que requirió la conversión a fase L.

- Producción de exoantígeno:

Para la producción de exoantígeno, se preparó agar GYE (glucosa 2 %, extracto de levadura 1 %, agar 1,5 %) se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120°C y 1 atm y se vertió 10 ml de agar por tubo de 150 x 10 mm con tapa a rosca, se dejó enfriar inclinado de manera tal que se formara un pico de flauta. Se realizaron los controles establecidos en el

procedimiento de control de calidad de medios de cultivo: (a) control de esterilidad incubando todos los tubos del lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) control de crecimiento inoculando, 2 tubos tomados al azar por lote, con *Candida parapsilosis* ATCC 22019 hasta observar crecimiento.

Sobre el medio de cultivo controlado se inoculó cada aislado y se incubó a 28°C durante 7 a 14 días, hasta obtener un crecimiento en más de $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del tubo.

Luego se preparó caldo GYE (glucosa 2 %, extracto de levadura 1 %), 200 ml en Erlenmeyer de 500 ml, se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120°C y 1 atm. A este medio se le realizó control de esterilidad incubando todos los Erlenmeyer del lote durante 48 h a 25-28 °C.

A partir del cultivo en tubo de cada aislado se subcultivó el caldo GYE y se incubó estático a 28°C por 30 días aproximadamente. Luego, se tomó una primera alícuota de aproximadamente 12 ml que se concentró por congelación [Canteros 2005a]. Brevemente, se colocó la alícuota en un tubo de 15 ml con tapa a rosca y se centrifugó 10 min a 4000 rpm en centrifuga refrigerada. Se tomó el sobrenadante y se esterilizó por filtración, primero con unidad filtrante de 0,45 μm y luego de 0,22 μm . El volumen filtrado se colocó en un tubo de 15 ml con tapa a rosca y se dejó a -20°C toda la noche. Se sacó de -20°C y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se tomó con pipeta la porción superior del tubo que comenzaba a descongelarse (esta porción es de color marrón oscuro y donde se encuentra el antígeno concentrado) y se colocó en un tubo tipo eppendorf de 2 ml con tapa. Se realizó la prueba de inmunodifusión utilizando sueros y antígenos de referencia de *H. capsulatum* para determinar la presencia de los exoantígenos, H y/o M. Se registró la banda presente y el tiempo requerido para la producción del exoantígeno.

Genotipificación de cepas y aislados

- Extracción del ADN

La extracción ADN se realizó a partir de la fase L de todos los aislados según la técnica descrita por Möller *et al.* [Möller 1992]. Las levaduras se cultivaron en caldo GYE, en Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo, por 72 h a 37°C en agitación a 120 rpm. Se centrifugó el caldo de cultivo en centrifuga refrigerada, se separó el pellet y se lavó con 1,5 ml de *buffer* TES sin SDS (0,1 M Tris-HCl pH: 8, 10 mM EDTA pH: 8, 10 mM DTT). Se eliminó el sobrenadante y se agregó igual volumen de perlas de vidrio de entre 425–600 μm de diámetro (Sigma-Aldrich) y 0,5 ml de *buffer* TES con SDS (0,1 M Tris-HCl pH: 8, 10 mM EDTA pH: 8, 10 mM DTT, 2 % SDS). Para generar la ruptura de las células, se agitó en vórtex por 15 seg y se

enfrió en hielo por el mismo tiempo. Esta operación se repitió 10 veces. Luego, se agregó proteinasa K hasta una concentración final de 100 µg/ml y se incubó en bloque seco por 1 h a 55°C. A continuación, se agregó NaCl 5M hasta una concentración final 1,4M y CTAB 10 % hasta una concentración final de 1 %, se incubó por 10 min a 65°C en bloque seco. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo y se incubó por 30 min en hielo granizado. Se centrifugó en centrífuga refrigerada a 4°C por 10 min a 12000 rpm y se separó la fase acuosa. El ADN se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y sucesivamente un volumen de cloroformo, ambos procedimientos en centrífuga con las mismas condiciones mencionadas para el procedimiento anterior. Se separó la fase acuosa y se agregó 0,5 volúmenes de isopropanol frío, se incubó toda la noche a -20°C. Por último, se centrifugó, se secó el ADN a 56°C y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

- Purificación del ADN

El ADN extraído se purificó por la técnica propuesta por Perrotta *et al.* [Perrotta 2001]. A cada uno de los ADN resuspendidos en agua bidestilada se le añadió RNasa hasta concentración final 100 µg/ml y se incubó por 1 h a 37°C en bloque seco. Se agregó proteinasa K hasta una concentración final 50 µg/ml y se incubó nuevamente por 1 h a 37°C. Se llevó a volumen con *buffer* TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH: 8,0) y se realizaron dos extracciones sucesivas con un volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y un volumen de cloroformo, como se describieron en el proceso de extracción del ADN. La precipitación del ADN se realizó con etanol absoluto, 15 min en hielo granizado, se centrifugó en centrífuga refrigerada a 4°C por 10 min a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 70 %, se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó en idénticas condiciones, se secó el ADN y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

- Determinación de la concentración de ADN

La concentración del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa 1 % en *buffer* TAE 1X (Trizma Base 0,04 M, EDTA 0,001M, Ácido acético 0,1 %). Se sembraron en el gel 5 µl de ADN en loading *buffer* y 4 µl del marcador de masa (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, CA). La corrida se realizó durante 1 h a 10 V/cm; posteriormente se realizó el teñido con bromuro de etidio 10mg/ml durante 30 min. La intensidad de las bandas se visualizó en el sistema de imagen digital Gel Logic 212 PRO (Carestream, USA). La estimación semicuantitativa de cada muestra se realizó por comparación visual de las imágenes fotodocumentadas de los ADN de las cepas analizadas en comparación con el marcador. Los ADNs de todos los aislamientos se llevaron a una concentración final aproximada de 10 ng/µl y fueron mantenidos a -20°C

durante el periodo que duró el estudio.

- RAPD-PCR

El RAPD-PCR se realizó utilizando dos primers en la misma reacción: 1281 (5'-AACGCGCAAC) y 1283 (5'-GCGATCCCCA). La técnica se realizó con 5 µl de templado (10 ng de ADN de *H. capsulatum*) en 50 µl de volumen final, 0,6 µM de cada uno de los primers, 2 mM Cl₂Mg, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerasa y 1X de *buffer*. Las condiciones de reacción fueron un ciclo de 7 min a 94°C; seguido por 45 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 1 min a 72°C cada uno; y un ciclo final de 5 min a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador iCycler (BioRad, CA). Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa 2 % en *buffer* TAE 1X durante 1 h a 10 V/cm y fueron teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml. Se usó como marcador de peso molecular 1Kb DNA Plus (Invitrogen,CA). El RAPD-PCR fue realizado por triplicado, como mínimo para cada ADN. Los geles fueron fotodocumentados y guardados con prolongación tiff para su posterior análisis.

- Análisis de los perfiles RAPD-PCR

Las imágenes del RAPD-PCR fueron convertidas a formato tiff en 256 tonos de grises, y al menos 300 dpi de resolución en el procesador de imágenes Adobe Photoshop, v 6.0. Para la construcción de la base de datos se creó el experimento RAPD-PCR (base de datos) en el programa BioNumerics versión 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium, <http://www.applied-maths.com>). Las imágenes digitalizadas fueron ingresadas a la base de datos, convertidas y normalizadas. En todos los geles se colocó el patrón de banda (1 Kb) en el primer, al medio, y en el último carril como estándares para la normalización que es lo que permite realizar comparaciones intergeles. Se creó el experimento RAPD-PCR y con el primer gel ingresado se definió un sistema de referencia con base en la posición de las bandas de los estándares respectivos. Los siguientes geles ingresados al experimento fueron comparados con respecto al gel inicial normalizado. Una vez que las imágenes de todos los geles se normalizaron éstas se incluyeron en la base de datos. Se analizaron la cantidad y posición de las bandas electroforéticas aplicando el coeficiente de Dice con una tolerancia del 1 % y con el algoritmo UPGMA generando un dendrograma. La tolerancia indica el máximo desplazamiento permitido entre bandas de dos perfiles idénticos.

- Secuenciación de genes Arf, H-Anti, Ole y Tub

Se amplificaron los fragmentos de los genes utilizados previamente por Kasuga *et al.* [Kasuga 1999 y 2003] en estudios de filogeografía del hongo. Las PCRs se realizaron con los siguientes pares de primers:

- ✓ **Gen Arf:** arf1 (5'AGAATATGGGGCAAAAAGGA) y arf2 (5'CGCAATTCATCTTCGTTGAG);
- ✓ **Gen H-anti:** H-anti3 (5'CGCAGTCACCTCCATACTATC) y H-anti4 (5'GCGCCGACATTAACCC);
- ✓ **Gen Ole:** ole3 (5'TTTAAACGAAGCCCCACGG) y ole4 (5'CACCACCTCCAACAGCAGCA);
- ✓ **Gen Tub:** tub1 (5'GGTGGCCAAATCGCAAATC) y tub2 (5'GGCAGCTTCCGTTCTCAGT).

Cada reacción se realizó con 5 µl de templado en 50 µl de volumen final. La mezcla de reacción se preparó con 0,2 µM de cada primer, 0,5 U de Taq polimerasa, 2,5 mM de Cl₂Mg, 200 µM de dNTPS y 1X de *buffer* de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador Master Cycler ep gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) con el siguiente programa: desnaturalización inicial durante 5 min a 94°C; 12 ciclos de amplificación en gradiente: 15 seg a 94°C, 30 seg a 65°C (0,7°C/ciclo hasta 56°C), 1 min 72 °C; 20 ciclos de amplificación: 15 seg a 94°C, 30 seg a 56 °C, 1 min 72 °C; seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Se tomó 10 µl de cada uno de los productos de PCR, se mezcló con 2 µl de *buffer* de corrida y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2 % en *buffer* TAE 1X durante 1 h a 10V/cm. El gel fue teñido con bromuro de etidio 10 mg/ml y observado bajo luz UV para determinar la presencia de la banda de amplificación específica.

Una vez observado el fragmento amplificado se realizó la purificación de los mismos a partir del gel utilizando el kit comercial, QIAquick Gel Extraction (Qiagen, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se cortó desde el gel de agarosa la banda a purificar, se aproximó el peso del agar con la banda por diferencia de pesada, se agregó *buffer* QG (3 volúmenes cada 1 volumen de agarosa, 100 µg = 100 µl), y se incubó a 50°C por 10-15 min, hasta disolución completa de la agarosa. Luego se agregó un volumen de isopropanol y se agregó la mezcla a la columna de extracción provista por el kit, se centrifugó a temperatura ambiente por 1 min a 13000 rpm. Se lavó la columna con 0,75 ml de *buffer* PE, se centrifugó y se agregó 30-50 ml de *buffer* de elución EB. Para eluir el ADN de la columna se centrifugó 1 min a 13000 rpm y se conservó el volumen obtenido. Todos los *buffer* utilizados están incluidos dentro del kit.

Con cada uno de los productos de PCR purificado se realizó la reacción de secuenciación con 1 µL del reactivo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, CA), 1 µL de cada uno de los primers y 1 µL del ADN molde para un volumen final de 10 µL. La amplificación se realizó en un termociclador Master Cycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) con el siguiente programa: 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 20 seg a 50°C y 4 min a 60°C. El producto de esta reacción se purificó agregando al volumen de

reacción 2 µL de acetato de sodio 3M y 25 µL de etanol absoluto, se incubó en hielo 30 min y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 45 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 250 µL de etanol 70 %, se realizó una nueva centrifugación a 13000 rpm durante 30 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Por último, se dejó secar el pellet y se envió para su secuenciación en un secuenciador de ADN automático ABI 3500 (Applied Biosystems, CA) a la Plataforma de Secuenciación y Bioinformática del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Las secuencias de los genes estudiados de la cepa Downs (tipo del clado NAM1) y de la cepa G186B (progenie Panamá) fueron realizadas de nuevo en este trabajo.

- Análisis de secuencias

Las secuencias fueron amplificadas en ambas hebras “forward” y “reverse”. Las secuencias “forward” y “reverse” de cada gen de cada cepa fueron editadas, analizadas visualmente y arregladas, en caso que fuese necesario, utilizando el programa BioEdit v7.2.5 [Hall 1999]. A partir de cada secuencia “forward” y “reverse” de cada fragmento amplificado se generó una secuencia consenso por gen y por cepa. Con el mismo programa se generó un nuevo archivo (para cada uno de los genes) con todas las secuencias consenso y se realizó un alineamiento múltiple mediante la aplicación “ClustalW Multiple alignment”. Este alineamiento se verificó de forma visual. El archivo generado con las secuencias alineadas de cada gen por separado fue exportado al programa MEGA versión 6.0 para su análisis.

Para robustecer el análisis, se exportaron las secuencias de cada uno de los genes disponibles en GenBank, depositadas por Kasuga *et al.* [Kasuga 1999 y 2003] y Teixeira *et al.* [Teixeira 2016]. Las secuencias utilizadas se consignan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias seleccionadas para incluir en el MLST.

Cepa Clado	Acc. secuencias parciales de los genes			
	ARF	H-ANTI	OLE1	TUB1
H59 LAmB*	AF072365.1	JX458486.1	JX458505.1	
H68 LAmB*				JX431902.1
H60 LamA1	AF072352.1	JX458487.1	JX458506.1	JX431897.1
H61 LAmA1	AF072353.1	JX458488.1	JX458507.1	JX431898.1
2134 LAmA2	JX443630.1	JX458485.1	JX458503.1	JX431896.1
3356 RJ	GU320879.1	GU320909.1	GU321033.1	GU321059.1
3688 RJ	GU320834.1	GU320929.1	GU321025.1	GU321062.1
AC02 RJ	GU320858.1	GU320916.1	GU321013.1	GU321069.1
AC05 RJ	GU320859.1	GU320917.1	GU321021.1	GU321070.1
CA04 RJ	GU320844.1	GU320919.1	GU321022.1	GU321072.1
Hond5 LAmA1	JQ218424.1	JQ218364.1	JQ218403.1	JQ218387.1
Hond15 LAmA1	JQ218433.1	JQ218372.1	JQ218413.1	JQ218383.1
Hond26 LAmA1	JQ218436.1	JQ218378.1	JQ218420.1	JQ218392.1
IGS19 RJ	GU320855.1	GU320895.1	GU321001.1	GU321051.1
IGS4/5 RJ	GU320845.1	GU320922.1	GU321029.1	GU321074.1
RS01 RJ	GU320853.1	GU320921.1	GU321032.1	GU321080.1
RS09 RJ	GU320854.1	GU320894.1	GU321002.1	GU321052.1
H11 NAM 2	AF072342.1	JX458484.1	JX458500.1	JX431894.1
H91 África	JX443637.1	JX458495.1	JX458513.1	JX431906.1
H176 Holanda	JX443640.1	JX458498.1	JX458514.1	JX431908.1

*Se utilizaron las secuencias de dos cepas tipo para el clado LAmB ya que en la cepa H59 no estaba disponible el gen *TUB1*.

Para elegir el modelo de sustitución nucleotídica más conveniente se analizaron las secuencias alineadas de cada gen conjuntamente con las secuencias de referencia elegidas mediante la opción “selección de modelo” del programa MEGA v6.0, utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud (maximun likelihood $-\ln L$) y otros criterios predeterminados. De la tabla generada se consideró como mejor modelo para el análisis nucleotídico el que poseía el menor valor de $\ln L$.

RESULTADOS

Microorganismos

Las cepas seleccionadas fueron de diferentes orígenes clínicos y de diferentes provincias de Argentina: 16 de Buenos Aires, 9 de Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), 9 de Neuquén, 6 de Tucumán, 2 de Córdoba, 1 de Jujuy, 1 de Salta y 1 de Chubut. Un aislado de origen ambiental (suelo) procedía de la provincia de Buenos Aires.

Las cepas clínicas provenían principalmente de piel (n: 13), de SNC (n: 10), de sangre (n: 9) y de materiales de origen respiratorio (n: 5). El resto de los materiales clínicos (n: 8) fueron de diversos orígenes anatómicos. La mayoría de las cepas clínicas fueron aisladas de pacientes inmunocomprometidos (29 VIH+ y 4 con otras causas). Doce cepas provenían de pacientes sin causa de inmunocompromiso, una de ellas de un brote de histoplasmosis documentado en la provincia de Neuquén. La cepa aislada de suelo también estuvo asociada a la fuente de un brote en la provincia de Buenos Aires. Los datos obtenidos de los registros de la colección DMic y de las fichas de derivación de muestras (paciente, material de origen y enfermedad de base) fueron incluidos en una tabla confeccionada “ad hoc” (Tabla 2) para su posterior análisis.

Tabla 2. Datos de las cepas y aislados analizados.

DMic	Año de aislamiento	Procedencia	Características de la fuente del aislado		
			Género	Material de origen	Enfermedad de base
Humanos					
00334	2000	Jujuy	Masculino	LCR	desnutrido
01735	2001	Córdoba	Femenino	Líquido articular	VIH +
01747	2001	CABA	Masculino	Punción médula ósea	VIH +
01752	2001	CABA	Femenino	Biopsia hepática	VIH +
031457	2003	Tucumán	Masculino	LCR	SCIC
031830	2003	Neuquén	Masculino	Hemocultivo	VIH +
031834	2003	Neuquén	Masculino	Hemocultivo	VIH +
031835	2003	Neuquén	Masculino	Biopsia de pulmón	VIH +
031837	2003	Neuquén	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
031842	2003	Neuquén	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
031843	2003	Neuquén	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
042247	2004	Neuquén	Masculino	Hemocultivo/CI Brote	SCIC
042425	2004	Neuquén	Masculino	Hemocultivo	VIH +
042429	2004	Buenos Aires	Masculino	LCR	VIH +
042430	2004	Buenos Aires	Masculino	LCR	VIH +
062630	2006	Tucumán	Femenino	LCR	SCIC
062632	2006	Tucumán	Masculino	LCR	SCIC
062641	2006	CABA	Masculino	Biopsia de ganglio	SCIC
062706	2006	CABA	Masculino	Biopsia de piel	SCIC
062715	2006	Buenos Aires	Masculino	BAL	VIH +
062717	2006	Córdoba	Masculino	Biopsia de ganglio	VIH +
062770	2006	Buenos Aires	Masculino	BAL	VIH +
062774	2006	Buenos Aires	Masculino	BAL	SCIC
062775	2006	Buenos Aires	Masculino	Hemocultivo	VIH +
073061	2007	Buenos Aires	Femenino	Biopsia de duodeno	VIH +
073062	2007	Tucumán	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
073063	2007	CABA	Masculino	LCR	SCIC
073064	2007	CABA	Femenino	Biopsia de piel	SCIC
073065	2007	Buenos Aires	Femenino	Biopsia de piel	VIH +
073067	2007	Buenos Aires	Femenino	Biopsia de piel	VIH +
073069	2007	Neuquén	Masculino	Biopsia hepática	VIH +
073091	2007	Buenos Aires	Masculino	Hemocultivo	VIH +
073092	2007	Chubut	Masculino	Biopsia transbronquial	SCIC
073093	2007	Salta	Femenino	Biopsia de piel	VIH +
073104	2007	Buenos Aires	Masculino	Hemocultivo	VIH +
073105	2007	Tucumán	Femenino	LCR	LES
073107	2007	CABA	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
073123	2007	CABA	Femenino	Biopsia de piel	TC
073124	2007	Buenos Aires	Masculino	Punción médula ósea	TC
083285	2008	Buenos Aires	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
083392	2008	Buenos Aires	Masculino	Hemocultivo	VIH +
083466	2008	Tucumán	Masculino	LCR	SCIC
083469	2008	Buenos Aires	Masculino	Hemocultivo	VIH +
093494	2009	CABA	Masculino	SNC	SCIC
103664	2010	Buenos Aires	Masculino	Biopsia de piel	VIH +
Ambiental					
093635	2009	Buenos Aires	No aplica	Suelo/Brote	No aplica

Abreviaturas. CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, LCR: Líquido Cefalorraquídeo, BAL: Lavado broncoalveolar, SNC: Sistema Nervioso Central, VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana, SCIC: sin causa de inmunocompromiso, CI/brote: caso índice asociado a brote en Patagonia, LES: lupus eritematoso sistémico, TC: Tratado con corticoides.

Identificación fenotípica de los aislados

Se analizaron fenotípicamente solo 31 aislados que ingresaron a la colección a partir de 2006 (año que comenzó esta investigación). Las restantes 15 cepas fueron ingresadas a la colección de cultivos DMic entre los años 2000 y 2004, y los registros no estaban completos. Como las características fenotípicas típicas de *H. capsulatum* se pierden o pueden variar en cepas mantenidas en colecciones no realizamos estudios fenotípicos en estas 15 cepas.

- Características macroscópicas de la fase M

Los 31 aislados presentaron una macromorfología en fase M compatible con *H. capsulatum*, micelio algodonoso color blanco que con el tiempo se tornó parduzco en el centro (Figura 1). En el reverso la mayoría de las colonias mostraron un pigmento color marrón característico de las colonias tipo B, en alguno de los aislamientos y en las cepas de referencia el reverso no mostró pigmento (Figura 2 A y B).



Figura 1. Características macromorfológicas predominantes en los aislados de *H. capsulatum* estudiados. Foto de anverso. (Agar SDA con antibiótico, 28 °C, 15 días)

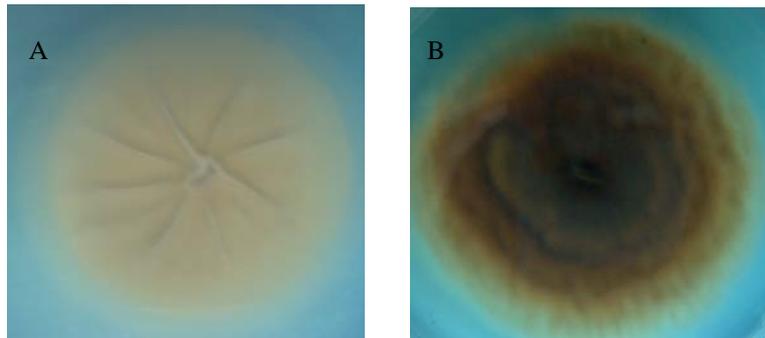


Figura 2. A: Colonia sin pigmento, B: Colonia con pigmento marrón. Foto de reverso.

La cepa de referencia Downs (DMic 021168), presentó características morfológicas únicas, con colonia glabra, crecimiento limitado, plegada y albina (colonia tipo A de la clasificación de Berliner) (Figura 3). La cepa de referencia G186B (DMic 01512) fue similar en macromorfología a la Downs, con menor plegamiento (Figura 4).



Figura 3. Macromorfología de la colonia fase M, cepa Downs. Foto de anverso.



Figura 4. Macromorfología de la colonia fase M, cepa G186B. Foto de anverso.

- Características microscópicas de la fase M

La mayoría de los aislados presentaron macroconidios globosos, de pared rugosa con proyecciones digitiformes de la pared. Se observó con frecuencia que los macroconidios emergían de conidióforos cortos que formaban un ángulo de 90° con la hifa de origen, característica distintiva de *H. capsulatum* (Figura 5). En algunos aislados se observaron, además, macroconidios piriformes de pared lisa sin proyecciones (Figura 6). Los microconidios fueron globosos o piriformes y de pared lisa (Figura 7).

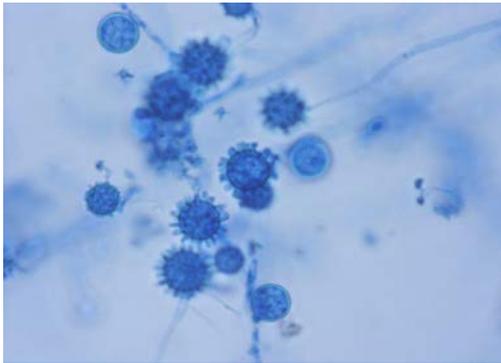


Figura 5. Detalle de macroconidios globosos con proyecciones digitiformes. (LF-AA 400X).

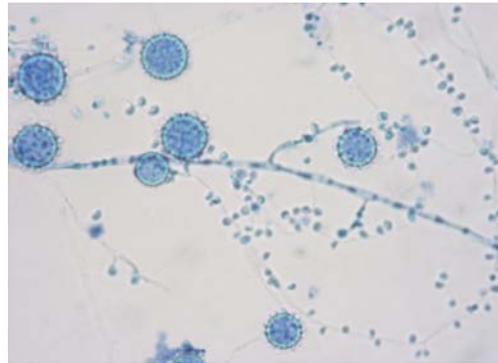


Figura 6. Macroconidios globosos con proyecciones. Se observan abundantes microconidios. (LF-AA 400X).

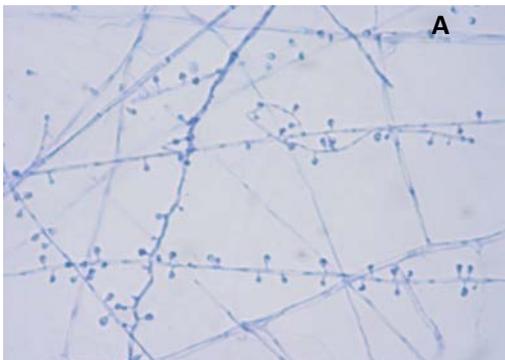


Figura 7. Micromorfología de cepa: (A) microconidios piriformes y (B) macroconidios y microconidios globosos. (LF-AA 400X).

Las cepas de referencia, Downs y G186B, no mostraron estructuras típicas de la especie; no desarrollaron conidios y presentaron un micelio septado, con hifas espiraladas y clamidoconidios terminales e intercalares (Figura 8).

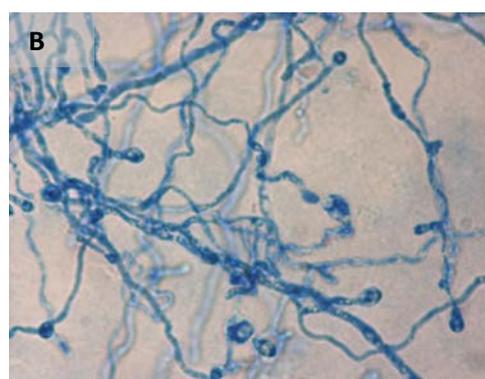
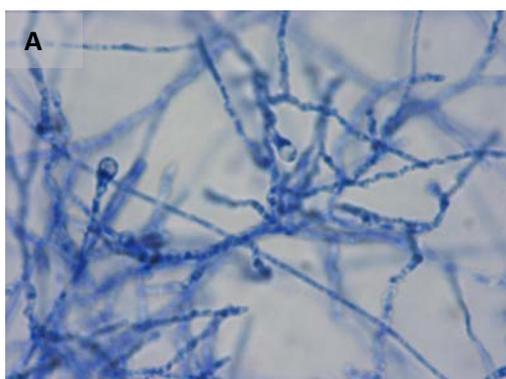


Figura 8. Micromorfología de la fase M de las cepas de referencia. A: cepa Downs y B: cepa G186B. (LF-AA 400X).

De los 31 aislados analizados solo dos presentaron micelio estéril, DMic 062717 y DMic 073062. La presencia o ausencia de macro y/o microconidios, o de micelio estéril se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Características micromorfológicas de los 31 aislados (2006-2010).

DMic	Procedencia	Macroconidias (M)	Microconidias (m)
Humanos			
062630	Tucumán	P	A
062632	Tucumán	P	A
062641	CABA	P	P
062706	CABA	P	P
062715	Buenos Aires	P	A
062717	Córdoba	A	A
062770	Buenos Aires	P	P
062774	Buenos Aires	P	P
062775	Buenos Aires	P	P
073061	Buenos Aires	P	P
073062	Tucumán	A	A
073063	CABA	P	P
073064	CABA	P	A
073065	Buenos Aires	P	P
073067	Buenos Aires	P	A
073069	Neuquén	P	P
073091	Buenos Aires	P	P
073092	Chubut	P	A
073093	Salta	P	P
073104	Buenos Aires	P	P
073105	Tucumán	P	A
073107	CABA	P	P
073123	CABA	P	A
073124	Buenos Aires	P	A
083285	Buenos Aires	P	P
083392	Buenos Aires	P	P
083466	Tucumán	P	A
083469	Buenos Aires	P	A
093494	CABA	P	A
103664	Buenos Aires	P	P
Ambiental			
093635	Buenos Aires	P	P

Las características de las cepas depositadas previamente a 2006 no fueron registradas en la base de datos de la colección de cultivos de DMic. CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, P: presentes, A: ausentes.

- Conversión de la Fase Micelial (M) a Levaduriforme (L) y Producción de exoantígeno

Los 31 aislados ingresados al estudio a partir de 2006 presentaron crecimiento en la fase L. El tiempo estimado de conversión fue entre 8 y 152 días, con una media de 49 días y una mediana de 38 días.

La producción de exoantígeno en medio líquido determinada por inmunodifusión fue positiva en todos los aislados. En 17/31 aislados se detectó banda H y M, en 5/31 solo banda H y en 3/31 solo banda M, y en 6 aislados no pudo reconocerse la banda detectada debido a la proximidad de las bandas en la inmunodifusión.

En la Tabla 4 se detallan los días requeridos para producir exoantígeno y la banda observada en cada uno de los aislados, además de los días necesarios para convertir a la fase L.

Tabla 4. Producción de exoantígeno y conversión de fase de 31 aislados.

DMic	Provincia	Producción de exoantígeno (días)	Banda de Antígeno H y M	Conversión a fase L (días)
Humanos				
062630	Tucumán	62	1 banda	18
062632	Tucumán	45	H y M	40
062641	CABA	34	H y M	11
062706	CABA	43	1 banda	32
062715	Buenos Aires	14	1 banda	14
062717	Córdoba	49	1 banda	115
062770	Buenos Aires	44	H y M	21
062774	Buenos Aires	44	H y M	62
062775	Buenos Aires	44	H y M	43
073061	Buenos Aires	54	H y M	19
073062	Tucumán	54	H	36
073063	CABA	111	H y M	16
073064	CABA	103	H y M	14
073065	Buenos Aires	93	H y M	24
073067	Buenos Aires	90	H y M	39
073069	Neuquén	45	M	31
073091	Buenos Aires	40	H y M	43
073092	Chubut	40	H y M	43
073093	Salta	40	H y M	22
073104	Buenos Aires	45	H y M	105
073105	Tucumán	24	H y M	38
073107	CABA	47	1 banda	23
073123	CABA	157	1 banda	82
073124	Buenos Aires	50	H	49
083285	Buenos Aires	56	H	63
083392	Buenos Aires	128	H y M	8
083466	Tucumán	68	M	152
083469	Buenos Aires	60	H	100
093494	CABA	78	M	36
103664	Buenos Aires	127	H y M	135
Ambiental				
093635	Buenos Aires	66	H	81

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Genotipificación de cepas y aislados

- Determinación de la concentración de ADN

Se evaluó la cantidad y calidad del ADN obtenido de cada microorganismo mediante visualización en gel de agarosa. En la Figura 9 se muestra un gel, a modo de ejemplo. La concentración de ADN se determinó por comparación visual de la intensidad de las bandas en comparación con el marcador de masa. Solo se conservaron los ADN con concentraciones ≥ 10

ng/ μ L. Cuando la concentración fue < 10 ng/ μ L. se repitió la extracción de ADN. Los ADN fueron conservados a -20°C debidamente rotulados con la concentración determinada. En el caso de concentraciones ≥ 10 ng/ μ L (Figura 9: líneas 2, 3, 6, 7 y 8), el ADN fue diluido antes de su uso en las reacciones de PCR a concentraciones de entre 10-20 ng/ μ L.

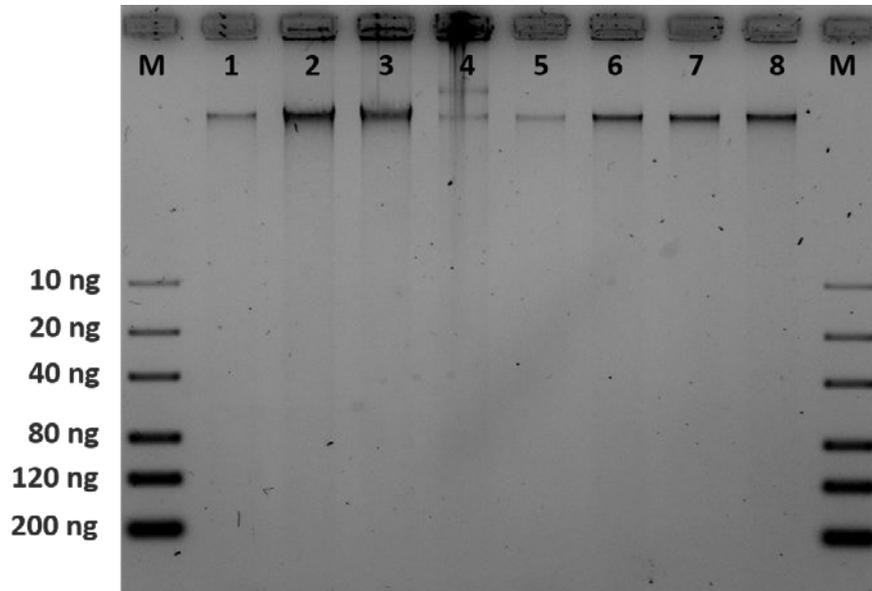


Figura 9. Detección y cuantificación de ADN extraído de las cepas de *H. capsulatum*. M: Marcador de Masa (Low DNA Mass Ladder), 1: 00334, 2: 021168 (G186B), 3: 062630, 4: 042247, 5: 073123, 6: 073061, 7: 031843, 8: 103664

- RAPD-PCR

Cuando se utilizó el método RAPD-PCR con doble oligonucleótido, 1281-1283, al análisis visual se observó en muchas de las cepas y aislados un patrón homogéneo de bandas al que denominamos perfil Argentino (AR), este perfil se observó en 33 de los ADNs analizados. Los 13 ADNs restantes presentaron diferentes patrones de bandas, a los que en conjunto denominamos perfiles No Argentinos (NAR). Los ADNs de las dos cepas de referencia también mostraron perfil NAR. En las figuras 10, 11 y 12 se muestran los perfiles de bandas obtenidos para cada uno de los aislados con los que se trabajó y las cepas de referencia. Algunas cepas están presentes más de una vez en las figuras, dado que el experimento se realizó por triplicado. Las cepas que presentaron perfil NAR fueron las siguientes: DMic 00334, DMic 01747, DMic 01752, DMic 031457, DMic 042247, DMic 042425, DMic 062630, DMic 062632, DMic 062715, DMic 062717, DMic 073069, DMic 073105 y DMic 093394, además de las dos cepas de referencia. Los mismos están indicados en las figuras.

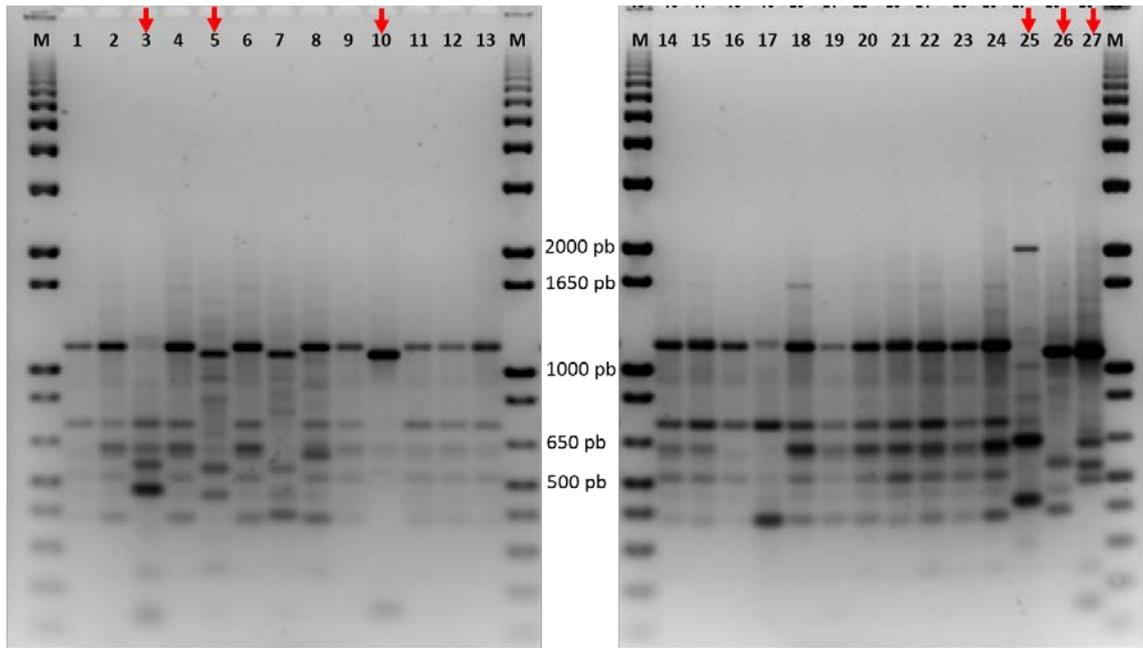


Figura 10. RAPD-PCR de aislados y cepas de *H. capsulatum*. M: Marcador de peso Molecular 1Kb Plus DNA Ladder, 1: 103664, 2: 093635, 3: 073069, 4: 073067, 5: 062717, 6: 062641, 7: 042247, 8: 073062 9: 093635, 10: 093494, 11: 083285, 12: 083469, 13: 083392, 14: 062706, 15: 073124, 16: 073123, 17: 073104, 18: 062775, 19: 062774, 20: 073093, 21: 073092, 22: 073091, 23: 042430, 24: 073064, 25: 042425, 26: 042247, 27: 031457.

↓ ADNs con perfil NAR

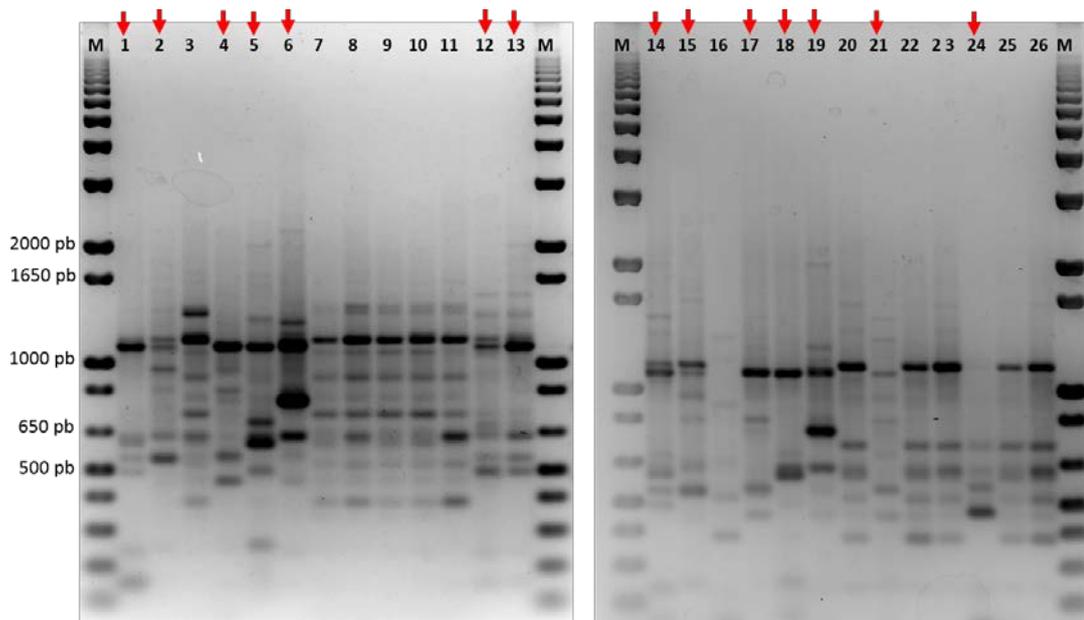


Figura 11. RAPD-PCR de aislados y cepas de *H. capsulatum*. M: Marcador de peso Molecular 1Kb Plus DNA Ladder, 1: 00334, 2: 01512 (G186B), 3: 01735, 4: 01752, 5: 01747, 6: 021168 (Downs), 7: 031830, 8: 031834, 9: 031835, 10: 031837, 11: 031843, 12: 062630, 13: 062632, 14: 00334, 15: 01512 (G186B), 16: 01735, 17: 01752, 18: 01747, 19: 021168 (Downs), 20: 062641, 21: 062717, 22: 031842, 23: 042429, 24: 073069, 25: 073104, 26: 073065.

↓ ADNs con perfil NAR

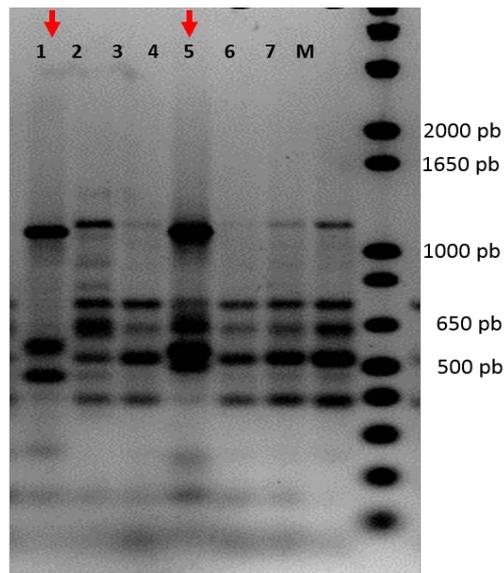


Figura 12. RAPD-PCR de aislados y cepas de *H. capsulatum*. M: Marcador de peso Molecular 1Kb Plus DNA Ladder, 1:, 073105 2: 073061, 3: 083466, 4: 073107, 5: 062715, 6: 073063, 7: 062770.

↓ ADNs con perfil NAR

- Análisis de perfiles RAPD-PCR

Cuando se analizaron las imágenes de los perfiles obtenidos por RAPD-PCR en el programa BioNumerics versión 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium, <http://www.applied-maths.com>) se obtuvo un dendrograma donde se observó un grupo mayoritario de 33 cepas que correspondía al denominado perfil AR. Los perfiles RAPD-PCR de las restantes 13 cepas, denominadas como NAR al examen visual de los geles, agruparon en diferentes grupos independientes a los que identificamos arbitrariamente como perfil NAR 1, NAR 2, NAR 3 y NAR 4 (Figura 13). En el grupo NAR 1 agrupó la cepa de referencia G186B (DMic 01512) conjuntamente con los aislados DMic 073069 de Neuquén, DMic 093394 de CABA, DMic 00334 de Jujuy y cuatro aislados de Tucumán DMic 031457, DMic 062630, DMic 062632 y DMic 073105. Lo más llamativo de este grupo fue que la mayoría de las cepas provenían de SNC (Tabla 1). El grupo denominado NAR 2 solo tuvo un representante DMic 01747 (MO de un paciente VIH+ de CABA), al igual que el grupo NAR 4 donde segregó la cepa DMic 042425 (sangre de un paciente VIH+ de Neuquén). El grupo NAR 3 estaba formado por las cepas DMic 01752, DMic 042247, DMic 062715 y DMic 062717 que se agruparon con la cepa de referencia Downs (DMic 021168) identificada como NAM1 por Kasuga *et al.* [Kasuga 2003].

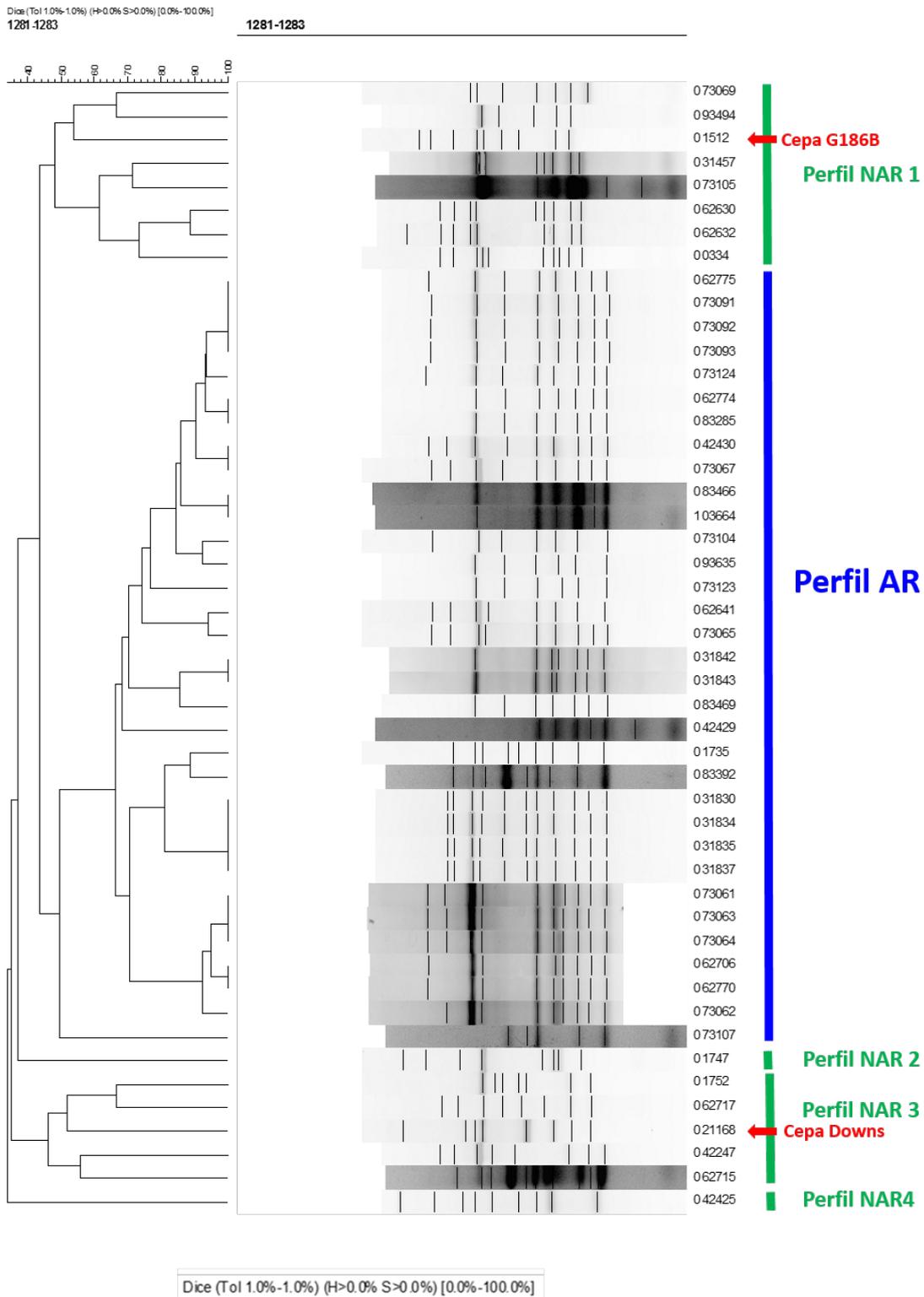


Figura 13. Dendrograma, gel normalizado y expresión gráfica de las bandas cromosómicas obtenidas por RAPD-PCR 1281-1283. Los datos mostrados proceden del análisis por UPGMA. A la derecha se señalan los grupos definidos.

- Secuenciación génica

La PCR previa a la secuenciación amplificó bandas de diferentes tamaños para cada uno de los genes: genes *Arf*, *H-anti* y *Ole* fragmentos de aproximadamente 420 pb, y gen *Tub* alrededor de 230 pb. Una vez realizadas las secuencias y arregladas visualmente en Bio Edit, de cada gen se analizaron fragmentos de 424 pb para gen *Arf*, 417 pb para gen *H-anti*, 426 pb para gen *Ole* y 232 pb para gen *Tub*.

- Análisis de secuencias

Como se indicó en Materiales y Métodos, el análisis utilizando el programa MEGA permitió determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica a utilizar para realizar los árboles de cada gen independientemente y en el estudio de múltiples locus. El mejor modelo para realizar los árboles filogenéticos resultó ser el de Jukes-Cantor (JC) para los cuatro genes, y fue el aplicado para analizar los alineamientos de cada gen independientemente y luego de forma conjunta en el MLST. La secuencia de los fragmentos analizados en el MLST fue: *Arf* (424 bp) +*H-anti* (417 bp) +*Ole* (426 bp) +*Tub* (232 bp). Los árboles filogenéticos fueron realizados con el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) con una confiabilidad en cada una de las ramas generada por 1000 réplicas (valores de bootstrap) (Figuras 14-17). Se incluyeron para el análisis secuencias depositadas por Kasuga *et al.* [Kasuga 2003] y las recientemente depositadas por Teixeira *et al.* [Teixeira 2016], donde aparecen los clados LAmA1, LAmA2 y RJ (Tabla 2) con el fin de robustecer los árboles y de esa manera obtener un resultado más preciso de las relaciones filogenéticas de las cepas Argentinas, sobre todo de las que no forman parte del clado LAmB.

En el árbol filogenético obtenido para el gen *Arf* (Figura 14) podemos ver un grupo clonal de 35 cepas que agruparon con H59 (secuencia de referencia) formando el clado LAmB (bootstrap: 95 %); 3 cepas agruparon con la cepa de referencia Downs, formando el clado NAm1 (bootstrap: 97 %); y un grupo de 8 cepas que agruparon con cepas de: Honduras (HOND1, HOND5 y HON26), EEUU (2134), Colombia (H61 y H62) y Río de Janeiro, Brasil (CA04), la mayoría LAmA (LAmA1 y LAmA2) excepto HOND1 identificada como clado Eurasia, que está anidado en el clado LAmA y CA04, la última recientemente identificada como un clado independiente llamado RJ, señalado como cercano a LAmA. En este grupo de 8 cepas esta más relacionado a una cepa del clados RJ (bootstrap: 65 %).

El árbol filogenético obtenido para el gen *H-anti* (Figura 15) nos muestra un grupo clonal de 34 cepas que agruparon con la H59, formando el clado LAmB (bootstrap: 96 %); las mismas 3 cepas volvieron a agrupar con la cepa de referencia Downs, formando el clado NAm1

(bootstrap: 85 %). Las mismas 8 cepas que formaban el clado con una cepa RJ en el árbol generado a partir de gen *Arf*, volvieron a agrupar relacionadas entre sí y con las cepas LAmA y RJ (Bootstrap: 95 %). Siete de éstas 8 cepas mostraron clonalidad, la restante (cepa DMic 01747) fue más cercana a las cepas LAmA1, LAmA2 y RJ, que el resto. Una cepa, DMic 073069, que había agrupado como LAmB previamente, en este árbol se separó independientemente de todos los grupos.

En el árbol filogenético obtenido para el gen *Ole* (Figura 16) podemos ver un grupo clonal de 35 cepas que agruparon con H59 formando el clado LAmB; las mismas 3 cepas, como con el análisis de los genes anteriores, agruparon con la Downs (NAm1) (bootstrap: 70 %). Como en el caso del árbol generado con el gen *H-anti*, las 8 cepas volvieron a agrupar relacionadas con las cepas LAmA y RJ (Bootstrap: 60 %), 7 de ellas con mayor relación entre sí y la cepa DMic 01747 más cercana a las cepas LAmA1, LAmA2 y RJ.

En el árbol filogenético obtenido para el gen *Tub* (Figura 17) podemos ver un grupo clonal de 33 cepas que agruparon, como con el análisis de los genes anteriores, formando el clado LAmB (Bootstrap: 61 %). Las mismas 3 cepas agruparon con la cepa Downs, formando el clado NAm1 (Bootstrap: 95 %) y 8 cepas formando un clado independiente (Bootstrap: 65 %), 7 de ellas previamente mostraron clonalidad en el análisis de otros genes y una cepa (DMic 083469 agrupada en los tres árboles previos como LAmB). La cepa DMic 01747 agrupó más próxima a LAmA2 y RJ y la DMic 073069 no formó grupo.

En líneas generales el análisis individual de los 4 genes mostró árboles con topografías muy similares entre sí, con las salvedades señaladas. En el análisis de MLST (Figura 18), el cual incluyó el total de 1499 pb de los cuatro genes, 35 cepas formaron el clado LAmB (Bootstrap: 94 %), junto a la secuencia de la cepas H59 (usada como referencia). Tres cepas agruparon como NAm1 junto a la cepa Downs (Bootstrap 94 %). La cepa DMic 01747 se clasificó como LAmA relacionada al clado RJ recientemente descrito. En este análisis las 7 cepas que mostraron clonalidad en los análisis individuales conformaron un clado muy consistente (bootstrap: 98 %) e independiente. La característica que distinguió a este grupo fue que todas cepas provenían de LCR de pacientes con manifestaciones en SNC, 5 de ellos sin causa de inmunocompromiso y residentes en la provincia de Tucumán. Proponemos a éste clado como nuevo en Sudamérica para el que sugerimos el nombre TUKMA (nombre de la provincia de Tucumán en lengua diaguita).

Los resultados obtenidos del análisis de los árboles de RAPD-PCR y MLST en relación a la Provincia de origen y material clínico se muestran en la Tabla 5.

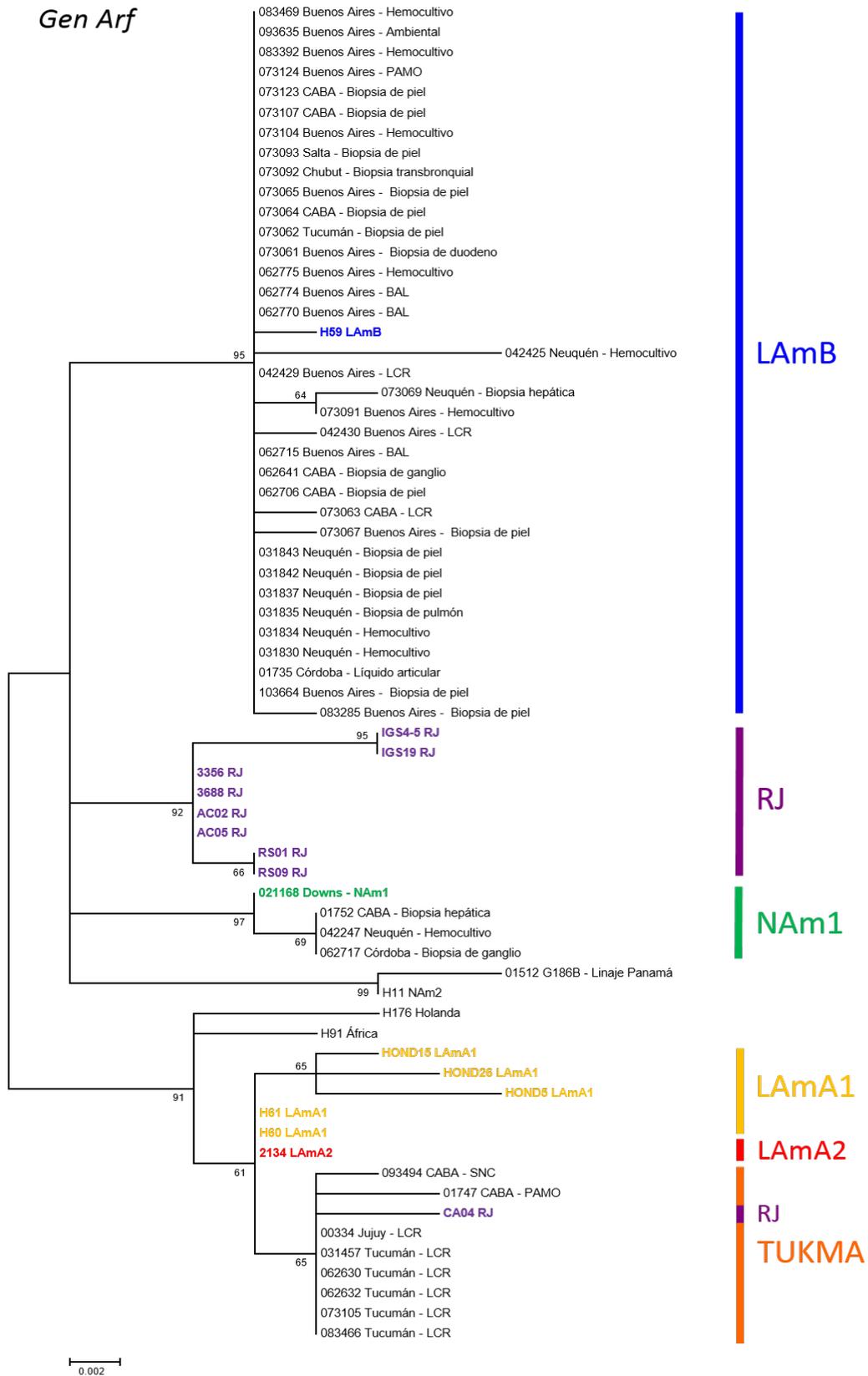


Figura 14. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen *Arf* generado por el programa MEGA V6.0 a partir del análisis de las secuencias de 424 bases. Bootstrap: 1000. Solo se indicó la frecuencia en las ramas cuando esta fue mayor a 50 %. A la derecha se muestran los clados formados y los nombres propuestos. Las secuencias de las cepas de referencia y las seleccionadas del GenBank se señalan en color en el árbol.

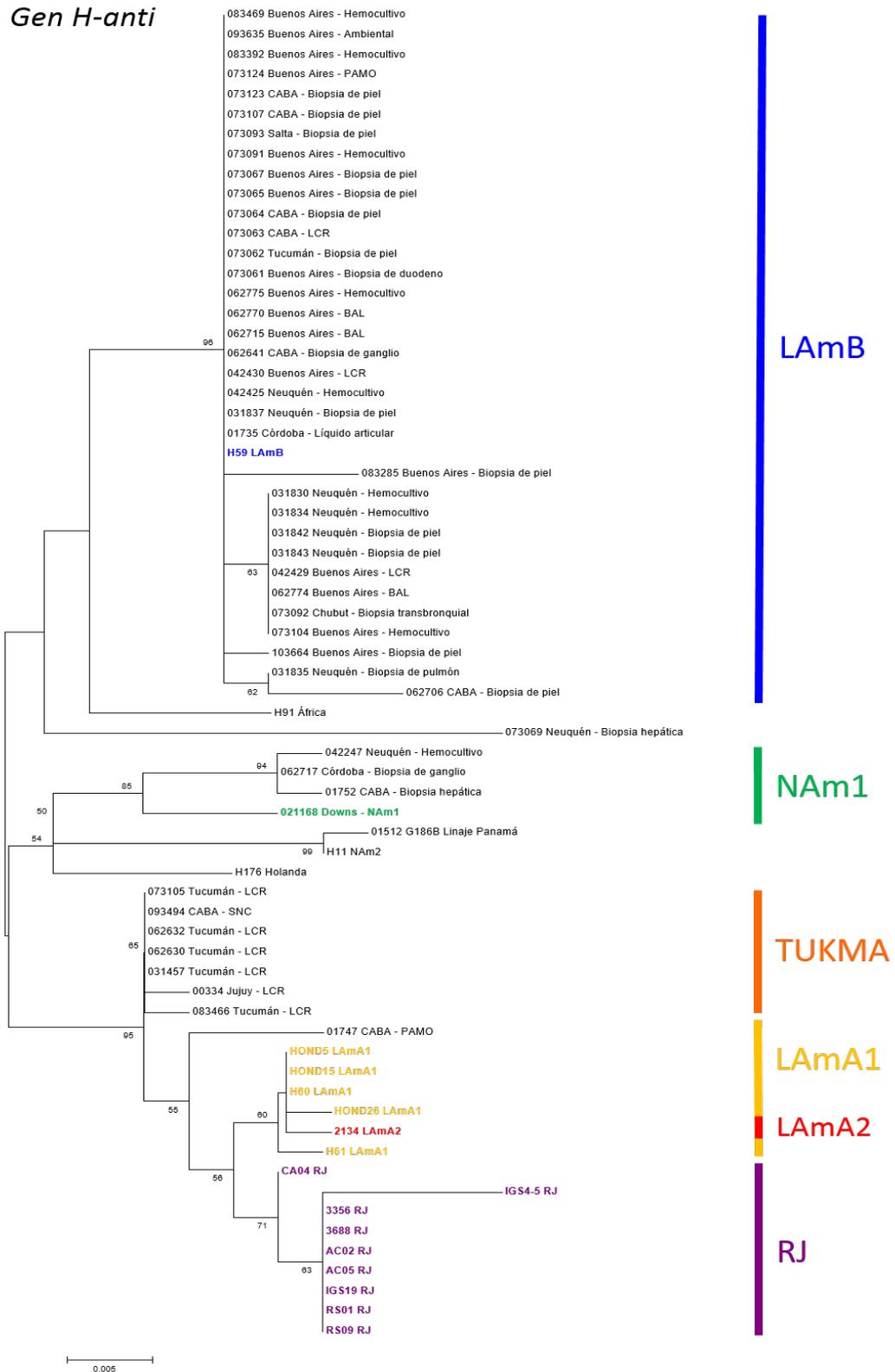


Figura 15. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen H-anti generado por el programa MEGA V6.0 a partir del análisis de las secuencias de 417 bases. Bootstrap: 1000. Solo se indicó la frecuencia en las ramas cuando esta fue mayor a 50 %. A la derecha se muestran los clados formados y los nombres propuestos. Las secuencias de las cepas de referencia y las seleccionadas del GenBank se señalan en color en el árbol

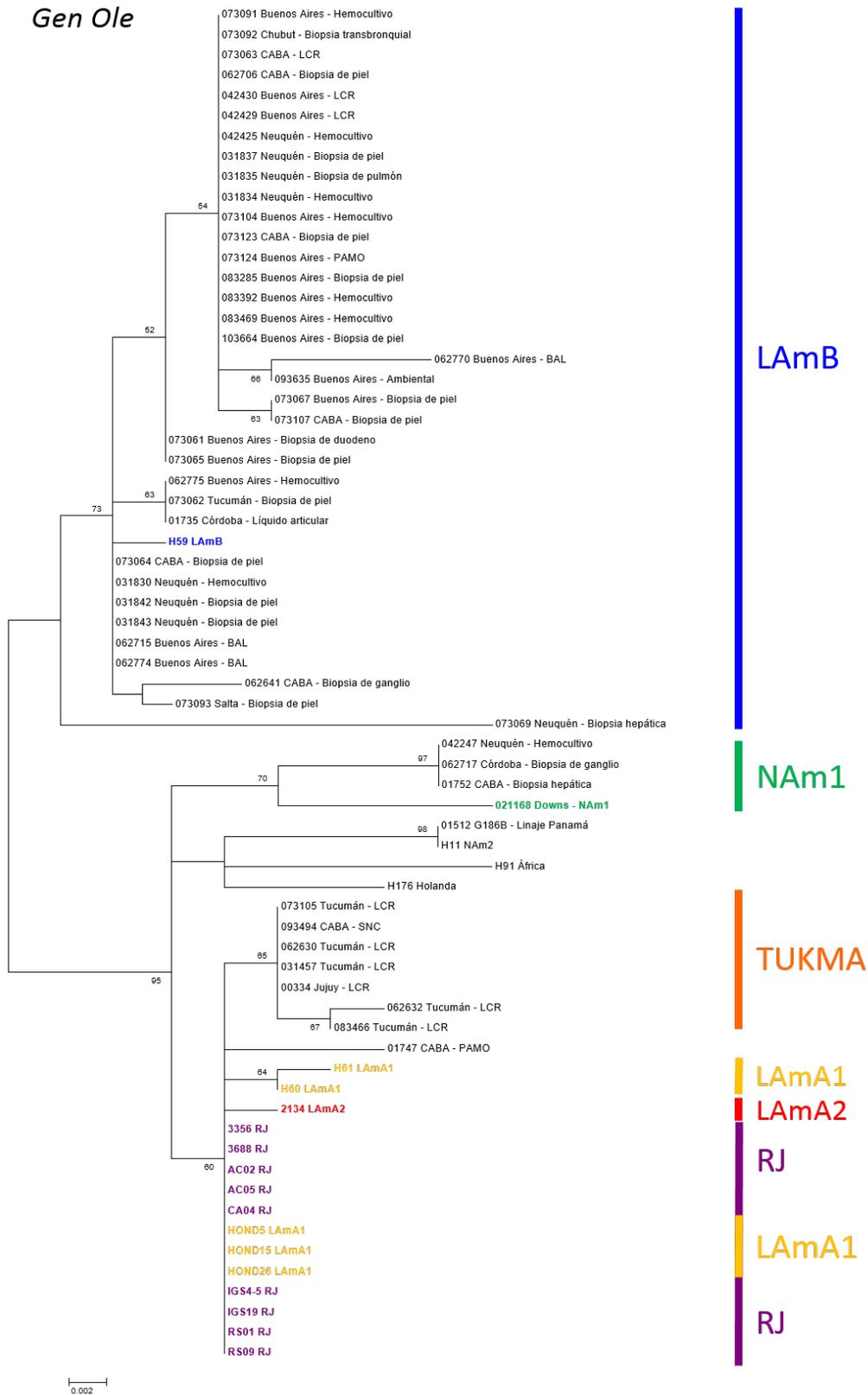


Figura 16. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen *Ole* generado por el programa MEGA V6.0 a partir del análisis de las secuencias de 426 bases. Bootstrap: 1000. Solo se indicó la frecuencia en las ramas cuando esta fue mayor a 50 %. A la derecha se muestran los clados formados y los nombres propuestos. Las secuencias de las cepas de referencia y las seleccionadas del GenBank se señalan en color en el árbol

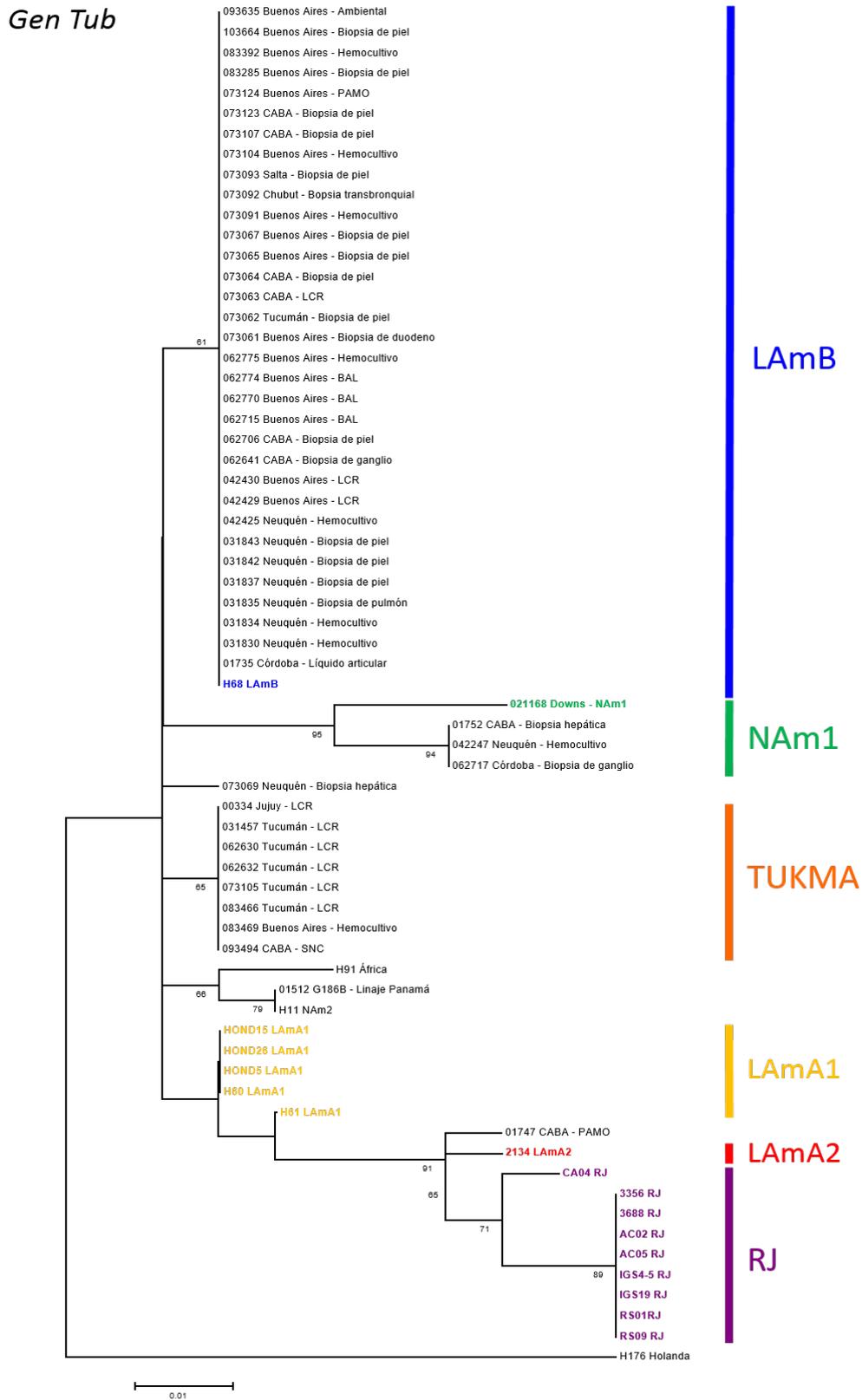


Figura 17. Árbol de Máxima Verosimilitud para el gen *Tub* generado por el programa MEGA V6.0 a partir del análisis de las secuencias de 232 bases. Bootstrap: 1000. Solo se indicó la frecuencia en las ramas cuando esta fue mayor a 50 %. A la derecha se muestran los clados formados y los nombres propuestos. Las secuencias de las cepas de referencia y las seleccionadas del GenBank se señalan en color en el árbol

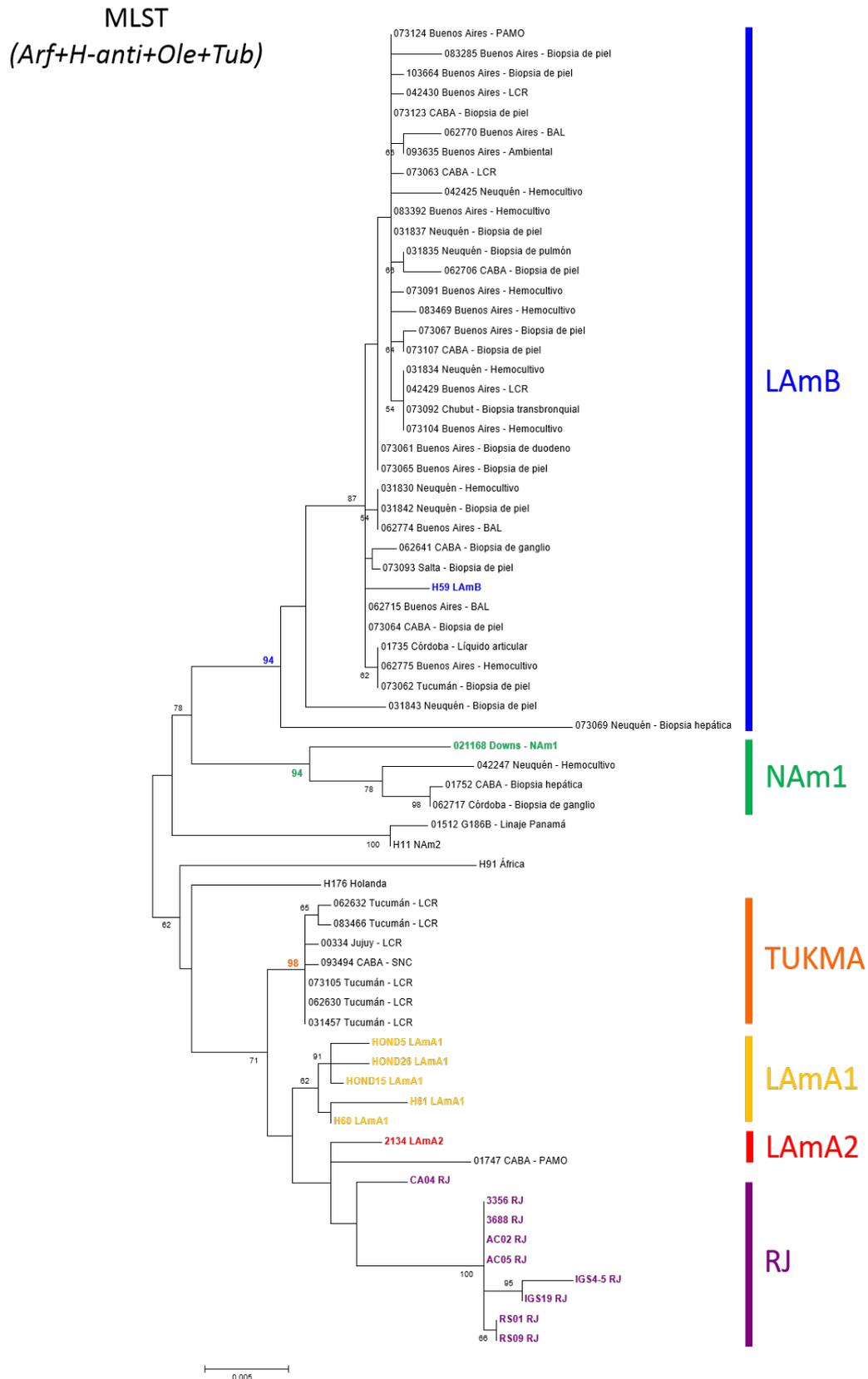


Figura 18. Árbol de Máxima Verosimilitud para el MLST (*arf, h-anti, ole y tub*) generado por el programa MEGA V6.0. Bootstrap: 1000. Solo se indicó la frecuencia en las ramas cuando esta fue mayor a 50 %. A la derecha se muestran los clados formados y los nombres propuestos. Las secuencias de las cepas de referencia y las seleccionadas del GenBank se señalan en color en el árbol.

Tabla 5. Resumen de resultados de las cepas y aislados analizados.

DMic	Año	Provincia	Material	CIC	M	m	PA (días)	BA	TTC (días)	RAPD-PCR	MLST
00334	2000	Jujuy	SNC	desnutrido						NAR1	TUKMA
01735	2001	Córdoba	Líquido articular	VIH +						AR	LAmB
01747	2001	CABA	MO	VIH +						NAR2	LAmA2
01752	2001	CABA	Higado	VIH +						NAR3	NAm1
031457	2003	Tucumán	SNC	SCIC						NAR1	TUKMA
031830	2003	Neuquén	sangre	VIH +						AR	LAmB
031834	2003	Neuquén	sangre	VIH +						AR	LAmB
031835	2003	Neuquén	pulmón	VIH +						AR	LAmB
031837	2003	Neuquén	piel	VIH +						AR	LAmB
031842	2003	Neuquén	piel	VIH +						AR	LAmB
031843	2003	Neuquén	piel	VIH +						AR	LAmB
042247	2004	Neuquén	sangre	CIB						NAR3	NAm1
042425	2004	Neuquén	sangre	VIH +						NAR4	LAmB
042429	2004	Buenos Aires	LCR	VIH +						AR	LAmB
042430	2004	Buenos Aires	LCR	VIH +						AR	LAmB
062630	2006	Tucumán	SNC	SCIC	P	A	62	1	18	NAR1	TUKMA
062632	2006	Tucumán	SNC	SCIC	P	A	45	H/M	40	NAR1	TUKMA
062641	2006	CABA	ganglio	ND	P	P	34	H/M	11	AR	LAmB
062706	2006	CABA	piel	ND	P	P	43	1	32	AR	LAmB
062715	2006	Buenos Aires	pulmón	VIH +	P	A	14	1	14	NAR3	LAmB
062717	2006	Córdoba	ganglio	VIH +	A	A	49	1	115	NAR3	NAm1
062770	2006	Buenos Aires	pulmón	VIH +	P	P	44	H/M	21	AR	LAmB
062774	2006	Buenos Aires	pulmón	VIH -	P	P	44	H/M	62	AR	LAmB
062775	2006	Buenos Aires	sangre	VIH +	P	P	44	H/M	43	AR	LAmB
073061	2007	Buenos Aires	intestino	VIH +	P	P	54	H/M	19	AR	LAmB
073062	2007	Tucumán	piel	VIH +	A	A	54	H	36	AR	LAmB
073063	2007	CABA	SNC	SCIC	P	P	111	H/M	16	AR	LAmB
073064	2007	CABA	piel	ND	P	A	103	H/M	14	AR	LAmB
073065	2007	Buenos Aires	piel	VIH +	P	P	93	H/M	24	AR	LAmB
073067	2007	Buenos Aires	piel	VIH +	P	A	90	H/M	39	AR	LAmB
073069	2007	Neuquén	higado	VIH +	P	P	45	M	31	NAR1	LAmB
073091	2007	Buenos Aires	sangre	VIH +	P	P	40	H/M	43	AR	LAmB
073092	2007	Chubut	pulmón	ND	P	A	40	H/M	43	AR	LAmB
073093	2007	Salta	piel	VIH +	P	P	40	H/M	22	AR	LAmB
073104	2007	Buenos Aires	sangre	VIH +	P	P	45	H/M	105	AR	LAmB
073105	2007	Tucumán	SNC	LES	P	A	24	H/M	38	NAR1	TUKMA
073107	2007	CABA	piel	VIH +	P	P	47	1	23	AR	LAmB
073123	2007	CABA	piel	TC	P	A	157	1	82	AR	LAmB
073124	2007	Buenos Aires	MO	TC	P	A	50	H	49	AR	LAmB
083285	2008	Buenos Aires	piel	VIH +	P	P	56	H	63	AR	LAmB
083392	2008	Buenos Aires	sangre	VIH +	P	P	128	H/M	8	AR	LAmB
083466	2008	Tucumán	SNC	SCIC	P	A	68	M	152	AR	TUKMA
083469	2008	Buenos Aires	sangre	VIH +	P	A	60	H	100	AR	LAmB
093494	2009	CABA	SNC	SCIC	P	A	78	M	36	NAR1	TUKMA
103664	2010	Buenos Aires	piel	VIH +	P	P	127	H/M	135	AR	LAmB
093635	2009	Buenos Aires	suelo	NA	P	P	66	H	81	AR	LAmB

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, CIC: causa de inmunocompromiso, M: macroconidios, m: microconidios, PA: producción de antígeno, BA: Bandas antigénicas presentes, TTC: tiempo de termoconversión, SCIC: sin causa de inmunocompromisos, CIB: caso índice del brote en la Patagonia, P: presente, A: ausente, AR: perfil argentino, NAR: perfil no Argentino,

Al analizar la concordancia entre los resultados obtenidos por RAPD-PCR y el MLST (Tabla 6) se observó 32/35 (91 %) cepas identificadas como del clado LAmB, tuvieron un perfil AR, solo una cepa con perfil AR (DMic 083466) fue posteriormente identificada por el análisis de MLST como clado TUKMA. Por otra parte, 3 cepas que en el RAPD-PCR segregaron como perfil NAR luego fueron clasificadas como LAmB por MLST.

Tabla 6. Concordancia entre los resultados obtenidos por RAPD-PCR y el MLST.

		RAPD- PCR Perfil AR	RAPD-PCR Perfil NAR
Especie filogenética o clado resultante del MLST	LAmB	32	3
	No LAmB	1	10
	LAmA2	0	1
	Clado TUKMA	1	6
	NAm 1	0	3

*Según la reciente clasificación de Teixeira *et al.* [Teixeira 2016].

En la República Argentina se han detectado en su mayoría cepas de *H. capsulatum* del clado LAmB (76 % de la población analizada). Es importante señalar que la única cepa ambiental analizada que fue aislada del suelo de la Provincia de Buenos Aires fue LAmB. En menor proporción se detectaron cepas del clado NAm1 (3 cepas, 6 %), una de ellas asociada a un brote ocurrido en la Patagonia y 1 cepa (DMic 01747) que agrupa estrechamente relacionada a cepas clado recientemente propuesto LAmA2. Un clado muy consistente formado por 7 cepas (15 %), con un bootstrap de 98 %, se separó de las cepas agrupadas como LAmA y RJ formando lo que proponemos como un nuevo clado o especie filogenética que denominamos TUKMA.

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron características fenotípicas y genotípicas de cepas de *H. capsulatum* seleccionadas de una colección de cultivos. La identificación microbiológica clásica (fenotípica) registrada se realizó en 31 aislados, que posteriormente se incluyeron en la colección. Se realizó la observación de la micro y macromorfología, la producción de antígenos extracelulares y la termoconversión dimórfica. La genotipificación del total de los microorganismos se realizó utilizando RAPD-PCR con primers 1281-1283 y el análisis de MLST de la secuencia parcial de cuatro genes. Esta última técnica, nos permitió reconocer las especies filogenéticas del complejo *H. capsulatum* circulantes en diferentes provincias de Argentina y analizar las relaciones filogenéticas entre ellas y con cepas de otras regiones geográficas.

Los 31 aislados analizados fenotípicamente presentaron mayoritariamente características macroscópicas y microscópicas compatibles con el género *Histoplasma*. Solo un 6 % (2/31) no mostró los macroconidios característicos y provenían de pacientes VIH positivos. En coincidencia con lo observado por otros autores, pensamos que estas alteraciones fenotípicas pueden estar asociadas a los tratamientos múltiples a los que suelen ser sometidos estos pacientes [Canteros 2005a, Zuiani 2006]. De los 31 aislados, la mayoría mostró bandas de precipitación H y M frente a suero de referencia por la técnica de ID. En algunos aislados se observó la presencia de bandas superpuestas que no pudieron ser identificadas como H y/o M. En menor número de aislados, se observó solo banda H o M. En *H. capsulatum* la obtención *in vitro* de la fase L es laboriosa y a veces poco exitosa. Berliner [Berliner 1968], quien dedicó muchos años a estudiar los morfotipos de este hongo, refiere en un estudio que solo pudo obtener la fase L en 39 % (14/36) de los aislados. El conocimiento de los requerimientos nutricionales (utilización de medios enriquecidos) y los avances realizados en la fisiología del hongo hicieron que los porcentajes de conversión dimórfica aumentaran en los hongos dimórficos, aunque no siempre llegan a cifras totales. En nuestro estudio se pudo convertir a fase L el 100 % de los aislados procesados, aunque los tiempos de conversión variaron notablemente [Promedio: 48,87 días, IC 95 % (35,07-62,67)]. Probablemente, este éxito se debió a los estrictos controles de calidad en la preparación de los medios y a la utilización del medio agar MLGema que está enriquecido con cisteína y yema de huevo, nutrientes que favorecen notablemente la conversión dimórfica [Fressatti 1992]. Cuando es imprescindible realizar la conversión, se recomienda realizar la inoculación experimental en animales; sin embargo, hay que considerar que la presión selectiva de un nuevo huésped

puede alterar características genotípicas de los aislados, con lo que siempre es recomendable utilizar el primocultivo o subcultivos con menor número de pasajes *in vitro* para realizar estudios moleculares. Esto fue descrito en estudios previos, donde se observaron variaciones en el número y tamaño de cromosomas de cepas de *H. capsulatum* obtenidos de un mismo paciente de diferentes sitios anatómicos y luego de sucesivos subcultivos [Canteros 2005b]. Por lo expuesto para los estudios moleculares tratamos de utilizar las cepas con menor número de subcultivos. Ambas características (producción de exoantígeno y tiempo de termoconversión) son importantes cuando estamos en presencia de cepas con morfología aberrante o con falta de estructuras microscópicas compatibles con *H. capsulatum* [Lacaz 1999, Morris 1986, Staib 1996, Zuiani 2006]. Los aislados de este estudio que presentaron micelio estéril (DMic 062717 y DMic 073062), fueron identificados sin mayor dificultad como *H. capsulatum* gracias a la producción de exoantígeno y la termocorversión.

La secuenciación y el análisis de MLST de los genes *Arf*, *Tub*, *H-Anti* y *Ole* nos permitió reconocer las especies filogenéticas de *H. capsulatum* circulantes en la Argentina. Coincidiendo con lo observado por otros autores la topografía de cada uno de los árboles originados con cada gen individualmente fue coincidente con el generado en el análisis de MLST [Kasuga 2003].

Desde los primeros estudios realizados por Kasuga *et al.* [Kasuga 1999 y 2003], varios autores se propusieron conocer la distribución de estas especies del hongo en las Américas utilizando diferentes marcadores moleculares y diversas técnicas [Brilhante 2012, Teixeira 2016, Zancopé-Oliveira 2005]. En un estudio realizado recientemente con un número importante de aislados de *H. capsulatum* de Argentina se analiza la diversidad genética de la especie comparando las secuencias de la región ITS [Landaburu 2014]. En coincidencia con estos autores que identifican dos cepas del clado NAM1 en nuestro país, nosotros identificamos tres cepas de dicho clado, dos de ellas de pacientes VIH+ residentes uno en CABA y otro en la provincia de Córdoba, la tercer cepa provenía del “caso índice” de un brote de histoplasmosis documentado en la ciudad de Zapala (Provincia de Neuquén). La importancia de este último aislado es que el paciente nunca viajó fuera de su provincia [Calanni 2013], con lo que inferimos que la especie está circulando en la naturaleza en nuestro país. En 2003, Kasuga *et al.* [Kasuga 2003], detectaron una cepa Argentina (H167) formando el clado NAM1, sin embargo, estos autores especularon que esta cepa no formaba parte de la especie filogenética NAM1 y la consideraron un linaje independiente debido a la gran distancia geográfica observada entre Argentina y EEUU, el lugar geográfico de aislamiento de las cepas

NAm1. Para confirmar o desestimar si la especie filogenética NAm1 está circulando en el Cono Sur de América debería ser analizado un mayor número de cepas.

Otro punto a analizar es que el clado NAm1 se ha asociado históricamente con los individuos inmunocomprometidos, puesto que son aislados poco virulentos en modelos de infección “in vivo” [Keath 1989a]. Sin embargo, recientemente Sepúlveda *et al.* [Sepulveda 2014], no pudieron comprobar que otra cepa del clado NAm1 (WU24) fuese más o menos virulenta en comparación con cepas virulentas del clado NAm2 (G217B) o linaje Panamá (G186A). Aportando al conocimiento de la fisopatogenia de *H. capsulatum*, podemos comentar que la cepa aislada del caso índice del brote patagónico [Calanni 2013], que segregó en el clado NAm1 (DMic 042247) fue capaz de producir histoplasmosis a cinco pacientes sin causa de inmunocompromiso, expuestos a una fuente común de contagio, por lo que podemos inferir que es patógena para hospederos inmunocompetentes. Esta cepa patagónica, desde los primeros estudios realizados con técnicas de RAPD-PCR con diferentes primers mostró un perfil distinto al resto de los aislados argentinos (perfil NAR) [Calanni 2013].

La expansión geográfica de *H. capsulatum* ha sido relatada a lo largo de la historia de su epidemiología en las Américas. Inicialmente los límites geográficos estaban entre paralelos 45° N y 30° S [Kwon-Chung 1992], luego los límites geográficos del hemisferio norte fueron ampliándose hasta Alberta, Canadá, latitud 55° N [Anderson 2006] y actualmente llega a Alaska, EEUU, latitud 64° N [Burek-Huntington 2014]. De igual manera, en el hemisferio sur de América los límites de expansión de *H. capsulatum* se ampliaron hasta el paralelo 38° S [Calanni 2013], y lo llamativo es que la especie filogenética encontrada está más relacionada genéticamente a las especies boreales (NAm1) que a las australes (LAmB).

Otra especie filogenética detectada en este estudio fue la LAmA2, que forma parte del mayor clado de especies identificadas de *H. capsulatum* [Galo 2013, Kasuga 2003, Teixeira 2016]. Como desconocemos si el paciente del que se aisló realizó viajes fuera de Argentina, no podemos descartar la opción de que la primoinfección haya ocurrido fuera de nuestro país, o que la especie filogenética LAmA esté circulando en Argentina.

El grupo de cepas que formaron el clado TUKMA merecen un especial análisis. Seis de estas siete cepas fueron aisladas de pacientes de provincias del noroeste Argentino (5 de Tucumán y 1 de Jujuy); la cepa restante era de una paciente de Buenos Aires, de la que desconocemos su historia residencial o de viajes a otras regiones del país. Llamativamente, este clado estaba formado por muestras aisladas de SNC, 5/7 pacientes no tenían inmunocompromiso; los dos

restantes si tenían inmunocompromiso: uno era un niño desnutrido y el otro un paciente en tratamiento con corticoides por LES. Los estudios filogenéticos nos hacen sugerir que se trata de un clado independiente formado por cepas con tropismo por SNC que además podrían tener una virulencia mayor con capacidad de provocar enfermedad en hospederos inmunocompetentes.

En la historia de la histoplasmosis, se describió que las cepas de *H. capsulatum* en el Río de la Plata provocaban lesiones cutáneas (45-75 % de los pacientes) [Karimi 2002, Negroni 1994, Pietrobon 2004] más frecuentemente que las cepas de otras regiones del continente Americano donde las lesiones de piel oscilan entre 10 y 17 % [Cunha 2007, Wheat 2003]. Como dato adicional, los pacientes del Cono Sur (previamente a la aparición de los antifúngicos) respondían favorablemente a tratamientos con TMS (trimetoprima sulfametoxazol), a diferencia de los pacientes de EEUU donde la droga no era efectiva [Rubinstein 1981]. Esta temprana observación sobre la sensibilidad de *H. capsulatum* a TMS y el marcado tropismo por piel de los aislados del Río de La Plata probablemente esté asociado a una característica particular de patogenicidad del clado LAmB. En nuestro estudio, llamativamente todas las cepas aisladas de piel fueron identificadas como LAmB.

Algunos autores postularon que algunos genotipos de *H. capsulatum* están asociados a la virulencia y a brotes epidémicos de histoplasmosis [Durkin 2004, Karimi 2002]. Un estudio reciente, donde se analizaron muestras de tejido de gatos con histoplasmosis provenientes de Colorado, California y Texas (EEUU) utilizando MLST, muestra que las cepas de *H. capsulatum* de los felinos, forman un clado filogenético separado de las especies predominantes en EEUU: NAm1 y NAm2; los autores postulan que las cepas capaces de infectar a los gatos y probablemente a otros mamíferos son diferentes genéticamente y con mecanismos de patogénesis distintos a las que infectan a seres humanos [Balajee 2013]. En coincidencia con lo postulado por estos autores nosotros planteamos que el clado TUKMA, descrito en este estudio, posee una fisiopatogenia diferente con marcado tropismo por SNC.

Uno de los objetivos particulares del estudio, considerando que la mayoría de las cepas circulantes en el país son clonales (LAmB) [Kasuga 2003], fue evaluar la posibilidad de utilizar una técnica más barata y accesible como el RAPD-PCR con primers 1281-1283 para detectar cepas genéticamente diferentes. Al analizar los resultados obtenidos por RAPD-PCR 1281-1283 y compararlos con los clados obtenidos por el análisis de MLST, comprobamos que el RAPD-PCR tipifica correctamente el 91 % de las cepas LAmB. Este método muy accesible podría ser una técnica de "screening" muy útil para detectar cepas LAmB. Estos resultados

ratifican observaciones de otros investigadores que utilizaron la misma combinación de primers, relacionando estrechamente el perfil RAPD-PCR con el origen geográfico de las cepas [Canteros 2005a y 2005c, Taylor 2005b]. El RAPD-PCR sería útil para identificar cepas LAmB (clado predominante en nuestro país) y utilizar secuenciación de los cuatro genes solo en aquellas cepas que muestren perfiles NAR en la técnica de RAPD-PCR 1281-1283 [Kasuga 2003, Teixeira 2016]. De hecho, el perfil de RAPD-PCR permitió reconocer la cepa del brote patagónico como una cepa diferente al clado LAmB y más asociada a cepas norteamericanas [Calanni 2013], hecho que se pudo confirmar en este trabajo, demostrando que la cepa es NAM1 o asociada a dicho clado.

El MLST, al permitir analizar una mayor variabilidad nucleotídica, permite un resultado más exacto en la identificación de especies filogenéticas. Estudiar los polimorfismos de los cuatro genes analizados originalmente por Kasuga *et al.* [Kasuga 1999 y 2003] para determinar las especies filogenéticas de *H. capsulatum* nos permitió comparar nuestros resultados con las secuencias de genes depositadas en bases de datos públicas como el GenBank, pudiendo determinar cuáles son las especies filogenéticas del hongo que están circulando en nuestro medio. La similitud genética observada en un gran número de cepas de pacientes argentinos analizadas confirma lo referido previamente [Landaburu 2014, Kasuga 2003, Teixeira 2016], que LAmB es un clado clonal y el predominante en el Cono Sur de América. No podemos descartar la aparición de otros clados asociados a formas clínicas características como el clado que nombramos TUKMA, y para esclarecer muchas preguntas todavía sin respuesta en la epidemiología de la histoplasmosis sería necesario analizar un mayor número de cepas del ambiente.

Para concluir esta discusión sería interesante replantear la idea de una de las pioneras en el estudio de la fisiología de *H. capsulatum*, quien planteó que para conocer a este hongo “*exasperantemente variable en su morfología y fisiología y establecer alguna correlación significativa entre origen, morfología, patogenicidad, antigenicidad, y habilidad termodimórfica hay que trabajar con aislamientos recientes y con una historia conocida*”.

CONCLUSIONES

De los 31 aislados analizados fenotípicamente, 29 mostraron estructuras típicas de la especie, solo dos aislados no mostraron macroconidios con proyecciones digitiformes, ni microconidios. Sin embargo, en estas dos cepas se detectaron antígenos específicos y la conversión dimorfa fue exitosa.

La técnica de RAPD-PCR (rápida y de bajo costo frente al MLST) tiene potencial como método de “screening” para reconocer el genotipo o especie filogenética LAmB (predominante en el cono Sur de América). El clado LAmB es monofilético y con la técnica de RAPD-PCR (1281-1283) muestra un perfil de bandas único y típico.

En Argentina, desde el año 2000 hasta 2010 circularon mayoritariamente cepas de *H. capsulatum* del clado LAmB.

En menor proporción se tipificaron cepas NAm1 (o asociadas estrechamente a este clado), LAmA2 y un genotipo característico de una zona geográfica que por características patogénicas proponemos que sea un clado independiente al que nombramos TUKMA.

El clado o especie filogeográfica TUKMA, endémica en Tucumán, posee tropismo por SNC y se asocia a pacientes sin causa aparente de inmunocompromiso. Si bien, en Tucumán se aisló también el genotipo LAmB en lesión de piel de un paciente VIH+.

La clonalidad observada en las cepas del clado TUKMA sugiere que estas podrían provenir de una fuente común de infección. Sin embargo, es necesario incluir un mayor número de cepas ambientales para confirmar estos hallazgos.

Una cepa Argentina que agrupa como NAm1, especie filogenética considerada endémica en EEUU, fue aislada de un brote de histoplasmosis en la provincia de Neuquén, en un paciente que nunca visitó otros países o regiones geográficas, con lo que se asume que esta especie filogenética o “progenie independiente muy cercana a NAm1” está circulando en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adenis AA, Aznar C, Couppié P. (2014) Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. *Curr Trop Med Rep.* 1:119-128.
2. Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstiuik C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S. (2006) Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. *Emerg Infect Dis.* 12(1):163-5.
3. Almeida Mde A, Pizzini CV, Damasceno LS, Muniz Mde M, Almeida-Paes R, Peralta RH, Peralta JM, Oliveira Rde V, Vizzoni AG, de Andrade CL, Zancopé-Oliveira RM. (2016) Validation of western blot for *Histoplasma capsulatum* antibody detection assay. *BMC Infect Dis.* 16:87.
4. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, Sarosi GA. (2015) Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. *Curr Trop Med Rep.* 2(2):70-80.
5. Balajee AS, Hurst SF, Chang LS, Miles M, Beeler E, Hale C, Kasuga T, Benedict K, Chiller T, Lindsley MD. (2013) Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. *Med Mycol.* 51(4):345-51.
6. Bauman DS, Smith CD. (1976) Comparison of immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2(2):77-80.
7. Bava AJ. (1995) Histoplasmosis in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 37(6):531-5.
8. Beguin H, Larcher G, Nolard N, Chabasse D. (2005) *Chrysosporium chiropterorum* sp. nov., isolated in France, resembling *Chrysosporium* state of *Ajellomyces capsulatus* (*Histoplasma capsulatum*). *Med Mycol.* 43(2):161-9.
9. Benedict K, Mody RK. (2016) Epidemiology of Histoplasmosis Outbreaks, United States, 1938-2013. *Emerg Infect Dis.* 22(3):370-8.
10. Berliner MD. (1968) Primary subcultures of *Histoplasma capsulatum*. I. Macro and micro-morphology of the mycelia phase. *Sabouraudia* 6:111-8.
11. Bialek R, Fischer J, Feucht A, Najvar LK, Dietz K, Knobloch J, Graybill JR. (2001) Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 39(4):1506-9.

12. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. (2002) Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. J Clin Microbiol. 40(5):1644-7.
13. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. (2003) Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. J Clin Microbiol. 41(4):1753-5.
14. Brandt ME, Gaunt D, Iqbal N, McClinton S, Hambleton S, Sigler L. (2005) False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe chemiluminescent test result caused by a *Chrysosporium* species. J Clin Microbiol. 43(3):1456-8.
15. Brilhante RS, Ribeiro JF, Lima RA, Castelo-Branco DS, Soares RM, Mesquita JR, Grangeiro TB, de Camargo ZP, Cordeiro RA, Rocha MF, Sidrim JJ. (2012) Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil. J Med Microbiol. 61:1688-95.
16. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. (2006) Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 25(10):665-8.
17. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. (2007) Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada. Enferm Infecc Microbiol Clin. 25(1):16-22.
18. Buitrago MJ, Canteros CE, Frías De León G, González Á, Marques-Evangelista De Oliveira M, Muñoz CO, Ramirez JA, Toranzo AI, Zancope-Oliveira R, Cuenca-Estrella M. (2013) Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. Rev Iberoam Micol. 30(4):256-60.
19. Burek-Huntington KA, Gill V, Bradway DS. (2014) Locally acquired disseminated histoplasmosis in a northern sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*) in Alaska, USA. J Wildl Dis. 50(2):389-92.
20. Calanni LM, Pérez RA, Brasili S, Schmidt NG, Iovannitti CA, Zuiani MF, Negroni R, Finkelievich J, Canteros CE. (2013) Outbreak of histoplasmosis in province of Neuquén, Patagonia Argentina. Rev Iberoam Micol. 30(3):193-9.
21. Canteros CE, Rivas MC, Soria M, Lee W, Perrotta D, Rodero L, Davel G, Grupo EMMB. (2004) Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: estudio multicéntrico en la República Argentina. Rev Argent Microbiol. 36(2):68-74.

22. Canteros CE. (2005a) Caracterización de cepas de *Histoplasma capsulatum* asociadas a histoplasmosis en pacientes con inmunocompromiso severo. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF pp. 93.
23. Canteros CE, Zuiani MF, Ritacco V, Perrotta DE, Reyes-Montes MR, Granados J, Zúñiga G, Taylor ML, Davel G. (2005b) Electrophoresis karyotype and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. FEMS Immunol Med Microbiol. 45(3):423-8.
24. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, Snaiderman L, Martínez M, Paladino M, Cicuttin G, Varela E, Alcoba E, Zuiani F, Sahaza JH, Taylor ML, Davel G. (2005c) First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*. Rev Argent Microbiol. 37(1):46-56.
25. Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. (1997) A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. Electrophoresis 18:1047–1053.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008) Outbreak of histoplasmosis among travelers returning from El Salvador--Pennsylvania and Virginia, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 57(50):1349-53.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014) Histoplasmosis outbreak associated with the renovation of an old house - Quebec, Canada, 2013. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 62(51):1041-4.
28. Chemaly RF, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, Chua JD, Procop GW. (2001) Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using the AccuProbe on an excised valve. J Clin Microbiol. 39(7):2640-1.
29. Cottle LE, Gkrania-Klotsas E, Williams HJ, Brindle HE, Carmichael AJ, Fry G, Beeching NJ. (2013) A multinational outbreak of histoplasmosis following a biology field trip in the Ugandan rainforest. J Travel Med. 20(2):83-7.
30. Cunha VS, Zampese MS, Aquino VR, Cestari TF, Goldani LZ. (2007) Mucocutaneous manifestations of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: Particular aspects in a Latin-American population. Clin Exp Dermatol. 32:250–5.
31. Damasceno LS, Leitão TM, Taylor ML, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. (2015) The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review.

- Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 35(1):19-27.
32. Darling ST. (1906) A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen, and lymph nodes. JAMA 46:1283-1285.
 33. Davel G, Canteros CE. (2007) Epidemiological status of mycoses in the Argentine Republic. Rev Argent Microbiol. 39(1):28-33.
 34. de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. (2000) p 708-11. En: Atlas of Clinical Fungi, Centra albureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira I Virgili. Reus, Spain.
 35. Durkin MM, Connolly PA, Karimi K, Wheat E, Schnizlein-Bick C, Allen SD, Alves K, Tewari RP, Keath E. (2004) Pathogenic differences between North American and Latin American strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in experimentally infected mice. J Clin Microbiol. 42(9):4370-3.
 36. Espinosa-Avilés D, Taylor ML, del Rocio Reyes-Montes M, Pérez-Torrez A. (2008) Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). J Zoo Wildl Med. 39(3):450-4.
 37. Esteban I, Minces P, De Cristofano AM, Negroni R, y Colaboradores. (2016). Central nervous system histoplasmosis in an immunocompetent pediatric patient. Arch Argent Pediatr. 114(3):e171-e174.
 38. Fandiño-Devia E, Rodríguez-Echeverri C, Cardona-Arias J, Gonzalez A. (2016) Antigen Detection in the Diagnosis of Histoplasmosis: A Meta-analysis of Diagnostic Performance. Mycopathologia. 181(3-4):197-205.
 39. Fressatti R, Dias-Siqueira VL, Svidzinski TI, Herrero F, Kimmelmeier C. (1992) A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* into its yeast-like form. Mem Inst Oswaldo Cruz. 87(1):53-8.
 40. Frías De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes MdelR. (2012) Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. J Clin Microbiol. 50(3):673-9.
 41. Furuie JL, Sun J, do Nascimento MM, Gomes RR, Waculicz-Andrade CE, Sessegolo GC, Rodrigues AM, Galvão-Dias MA, de Camargo ZP, Queiroz-Telles F, Najafzadeh MJ, de Hoog SG, Vicente VA. (2016) Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using

- rolling circle amplification. *Mycoses*. 59(1):12-9.
42. Galo C, Sanchez AL, Fontecha GA. (2013) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolates from Honduras. *Science Journal of Microbiology*. Article ID sjmb-288,7.
 43. Gaur PK, Lichtwardt RW. (1980) Comparative study of a new *Chryso sporium* species with *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*. 18(2):105-14.
 44. Guedes HL, Guimarães AJ, Muniz Mde M, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, Deepe GS Jr, Zancopé-Oliveira RM. (2003) PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *J Clin Microbiol*. 41(2):535-9.
 45. Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. (2006) Diagnosis of Histoplasmosis. *Braz J Microbiol*. 37(1):1-13.
 46. Hage CA, Ribes JA, Wengenack NL, Baddour LM, Assi M, McKinsey DS, Hammoud K, Alapat D, Babady NE, Parker M, Fuller D, Noor A, Davis TE, Rodgers M, Connolly PA, El Haddad B, Wheat LJ. (2011) A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 53(5):448-54.
 47. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA. (1992) Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *J Clin Microbiol*. 30(11):3003-4.
 48. Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser*. 41:95-98.
 49. Huffnagle KE, Gander RM. (1993) Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. *J Clin Microbiol*. 31(2):419-21.
 50. Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, Eimen T, Lindsley MD, Cali S, Conover CS, Dworkin MS. (2005) Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. *Environ Health Perspect*. 113(5):585-9.
 51. Ibarra Camou B, Toranzo AI, Lee W, Davel G, Canteros CE. (2011) Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* in culture lysates. *Rev Iberoam Micol*. 28(1):26-31.
 52. Ibarra Camou B, López-Joffre M.C., Toranzo A.I., Salas D.H., Davel G., Refojo N., Canteros C.E. (2015) Especies filogenéticas de *Histoplasma capsulatum* circulantes en argentina. *Infocus 2015. Resumen 2015_195_TI*, Córdoba, Argentina.
 53. Jiménez RA, Urán ME, de Bedout C, Arango M, Tobón AM, Cano LE, Restrepo A. (2002) Outbreak of acute histoplasmosis in a family group: identification of the infection source.

- Biomedica. 22(2):155-9.
54. Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, Alves K, Lacaz Cd Cda S, Keath E. (2002) Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis.* 186(11):1655-60.
 55. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. (1999) Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol.* 37(3):653-63.
 56. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol.* 12(12):3383-401.
 57. Kauffman CA. (2007) Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev.* 20(1):115-32.
 58. Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. (1989a) Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect. Immun.* 57:1384–1390
 59. Keath EJ, Spitzer ED, Painter AA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. (1989b) DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol.* 27(10):2369-72.
 60. Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. (1992) Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J Clin Microbiol.* 30(8):2104-7.
 61. Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. (1992) Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol.* 174(22):7075-9.
 62. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1992) Histoplasmosis, p 464-513. En: *Medical Mycology*, 3ra Ed. Editorial Lea & Febiger, Philadelphia.
 63. Lacaz Cd, Del Negro GM, Vidal MS, Heins-Vaccari EM, Santos RF, Martins MA, Ozaki MM, Romiti R, Proenca R, Castro LG. (1999) Atypical disseminated cutaneous histoplasmosis in an immunocompetent child, caused by an "aberrant" variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 41(3):195-202.
 64. Lamps LW, Molina CP, West AB, Haggitt RC, Scott MA. (2000) The pathologic spectrum of

- gastrointestinal and hepatic histoplasmosis. *Am J Clin Pathol.* 113(1):64-72.
65. Landaburu F, Cuestas ML, Rubio A, Elías NA, Daneri GL, Veciño C, Iovannitti CA, Mujica MT. (2014) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from Argentina based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed spacer regions of rDNA. *Mycoses* 57(5):299–306.
 66. Landis J, Koch G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*; 33: 159-74.
 67. Lyon GM, Bravo AV, Espino A, Lindsley MD, Gutierrez RE, Rodriguez I, Corella A, Carrillo F, McNeil MM, Warnock DW, Hajjeh RA. (2004) Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *Am J Trop Med Hyg.* 70(4):438-42.
 68. Mahvi TA. (1970) Factors governing the epidemiology of *Histoplasma capsulatum* in soil. *Mycopathol Mycol Appl.* 41(1):167-76.
 69. Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusiano G, Gorodner J. (1996) Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 38(5):349-53.
 70. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. (2003) Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 41(3):1295-8.
 71. Martínez Méndez D, Hernández Valles R, Alvarado P, Mendoza M. (2013) Mycoses in Venezuela: Working Groups in Mycology reported cases (1984-2010) *Rev Iberoam Micol.* 3; 30(1):39-46.
 72. Marukutira T, Huprikar S, Azie N, Quan SP, Meier-Kriesche HU, Horn DL. (2014) Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study. *HIV AIDS (Auckl).* 6:39-47.
 73. Masih DT, Marticorena BE, Borletto N, Farías C, Negroni R. (1987) Epidemiologic study of bronchopulmonary micosis in the province of Cordoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 29(1):59-62.
 74. Maubon D, Simon S, Aznar C. (2007) Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58(4):441-4.

75. 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(22):6115-6.
76. Morgan J, Cano MV, Feikin DR, Phelan M, Monroy OV, Morales PK, Carpenter J, Weltman A, Spitzer PG, Liu HH, Mirza SA, Bronstein DE, Morgan DJ, Kirkman LA, Brandt ME, Iqbal N, Lindsley MD, Warnock DW, Hajjeh RA; Acapulco Histoplasmosis Working Group. (2003) A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *Am J Trop Med Hyg.* 69(6):663-9.
77. Morris PR, Terreni AA, DiSalvo AF. (1986) Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*-an unusual variant. *J Med Vet Mycol.* 24(3):231-3.
78. Muniz MM, Pizzini CV, Peralta JM, Reiss E, Zancopé-Oliveira RM. (2001) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from soil, animals, and clinical specimens in Rio de Janeiro State, Brazil, by a PCR-based random amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol.* 39(12):4487-94.
79. Muniz M de M, Morais E Silva Tavares P, Meyer W, Nosanchuk J D, Zancopé-Oliveira RM. (2010) Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl Environ Microbiol* 76:4438–4447.
80. Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, Muskus C, Cano LE, González A. (2010) Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol.* 17(1):62-7.
81. Nacher M, Adenis A, Adriouch L, Dufour J, Papot E, Hanf M, Vantilcke V, Calvez M, Aznar C, Carme B, Couppié P. (2011) What is AIDS in the Amazon and the Guianas? Establishing the burden of disseminated histoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg.* 84(2):239-40.
82. Nacher M, Adenis A, Mc Donald S, Do Socorro Mendonca Gomes M, Singh S, et al. (2013) Disseminated Histoplasmosis in HIV-Infected Patients in South America: A Neglected Killer Continues on Its Rampage. *PLoS Negl Trop Dis* 7(11): e2319.
83. Nacher M, Adenis A, Aznar C, Blanchet D, Vantilcke V, Demar M, Carme B, Couppié P. (2014) How many have died from undiagnosed human immunodeficiency virus-associated histoplasmosis, a treatable disease? Time to act. *Am J Trop Med Hyg.* 90(2):193-4.
84. Negroni R. (1990) Micosis en pacientes con SIDA. *Rev Argent Microbiol.* 13 (1): 3-14.

85. Negroni R, Robles AM, Arechavala A. (1994) Histoplasmosis progresiva. Estudio en un lapso de 10 años. Rev. Arg. Micología. 17:14-21.
86. Negroni R, Duré R, Ortiz Nareto A, Arechavala AI, Maiolo EI, Santiso GM, Iovannitti C, Ibarra-Camou B, Canteros CE. (2010) Histoplasmosis outbreak in Morón, Buenos Aires Province, Argentina. Rev Argent Microbiol. 42(4):254-60.
87. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. (2010) An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Intern Med. 49(5):491-5.
88. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. (2013) Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. J Infect Chemother. 19(5): 999-1003.
89. Padhye AA, Smith G, McLaughlin D, Standard PG, Kaufman L. (1992) Comparative evaluation of a chemiluminescent DNA probe and an exoantigen test for rapid identification of *Histoplasma capsulatum*. Clin Microbiol. 30(12):3108-11.
90. Passos AN, Kohara VS, de Freitas RS, Vicentini AP. (2015) Immunological assays employed for the elucidation of an histoplasmosis outbreak in São Paulo, SP. Braz J Microbiol. 45(4):1357-61.
91. Pedroza-Seres M, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML. (1994) The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in Mexico: a preliminary study. J Med Vet Mycol. 32(2):83-92.
92. Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Rodero L, Davel G. (2001) Caracterización molecular de aislamientos clínicos autóctonos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* mediante RAPD-PCR. Rev Argent Microbiol. 33(3):160-6.
93. Pietrobon D, Negro-Marquín L, Kilstein J, Galíndez J, Greca A, Battagliotti C. (2004) Disseminated histoplasmosis and AIDS in an Argentine hospital: clinical manifestations, diagnosis and treatment. Enferm Infecc Microbiol Clin. 22(3):156-9.
94. Picardi JL, Kauffman CA, Schwarz J, Phair JP. (1976) Detection of precipitating antibodies to *Histoplasma capsulatum* by counterimmunoelectrophoresis. Am Rev Respir Dis. 114(1):171-6.
95. Pizzini CV, Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. (1999) Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. Clin

- Diagn Lab Immunol. 6(1):20–23.
96. Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazawa K, Mikami Y, Ando A, Nagata Y. (1998) Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. J Clin Microbiol. 36(10):3073-6.
 97. Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. (1999) Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. J Clin Microbiol. 37(5):1404-8.
 98. Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Parás-García A, Juan-Sallés C, Taylor ML. (2009) Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. Rev Argent Microbiol. 41(2):102-4.
 99. Richer SM, Smedema ML, Durkin MM, Herman KM, Hage CA, Fuller D, Wheat LJ. (2016) Improved Diagnosis of Acute Pulmonary Histoplasmosis by Combining Antigen and Antibody Detection. Clin Infect Dis. 62(7):896-902.
 100. Rocha-Silva F, Figueiredo SM, Silveira TT, Assunção CB, Campolina SS, Pena-Barbosa JP, Rotondo A, Caligiorne RB. (2013) Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave-Minas Gerais state, Brazil. Med Mycol Case Rep. 4:1-4.
 101. Rubinstein P, Negroni R. (1981) Histoplasmosis, pp. 249-290. En: Micosis broncopulmonares del adulto y el niño. 2da Ed. Editorial Beta SRL, Buenos Aires.
 102. Sandin RL, Isada CM, Hall GS, Tomford JW, Rutherford I, Rogers AL, Washington JA. (1993) Aberrant *Histoplasma capsulatum*. Confirmation of identity by a chemiluminescence-labeled DNA probe. Diagn Microbiol Infect Dis. 17(3):235-8.
 103. Scheel CM, Zhou Y, Theodoro RC, Abrams B, Balajee SA, Litvintseva AP. (2014) Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. J Clin Microbiol. 52(2):483-8.
 104. Sepúlveda VE, Williams CL, Goldman WE. (2014) Comparison of phylogenetically distinct *Histoplasma* strains reveals evolutionarily divergent virulence strategies. mBio. 5(4):e01376-14.
 105. Simon S, Veron V, Boukhari R, Blanchet D, Aznar C. (2010) Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. Diagn

- Microbiol Infect Dis. 66(3):268-73.
106. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. (1989) Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 57(5):1409-12.
 107. Staib F, Grosse G. (1996) Brown-red pigment formation by the mycelial phase of a clinical isolate of *Histoplasma capsulatum* on Staib agar. A preliminary report. Zentralbl Bakteri. 283(4):515-21.
 108. Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts GD. (1993) Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Histoplasma capsulatum*. J Clin Microbiol. 31(4):845-50.
 109. Sutton DA, Padhye AA, Standard PG, Rinaldi MG. (1997) An aberrant variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. J Clin Microbiol. 35(3):734-5.
 110. Tamura M, Kasuga T, Watanabe K, Katsu M, Mikami Y, Nishimura K. (2002) Phylogenetic characterization of *Histoplasma capsulatum* strains based on ITS region sequences, including two new strains from Thai and Chinese patients in Japan. Jpn J Med Mycol 43:11-19.
 111. Taylor ML, Granados J, Toriello C. (1996) Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. Mycoses. 39(9-10):375-9.
 112. Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusko JK, Granados J. (1997) Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the State of Guerrero, Mexico. Mycopathologia. 138(3):137-42.
 113. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. (1999) Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. Am J Trop Med Hyg. 61(6):914-9.
 114. 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(3):207-12.
 115. Taylor ML, Ruíz-Palacios GM, del Rocío Reyes-Montes M, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Alvarez RO,

- Roldán-Aragón YA, Romero-Martínez R, Sahaza-Cardona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval GR. (2005a) Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 45(3):435-41.
116. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, del Rocio Reyes-Montes M, del Valle MB, Zúñiga G. (2005b) Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 45(3):451-8.
117. Taylor ML, Hernández-García L, Estrada-Bárceñas D, Salas-Lizana R, Zancopé-Oliveira RM, García de la Cruz S, Galvão-Dias MA, Curiel-Quesada E, Canteros CE, Bojórquez-Torres G, Bogard- Fuentes CA, Zamora-Tehozol E. (2012) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil, and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions. *Fungal Biol.* 116:308–317.
118. Teixeira M de M, Patané JS, Taylor ML, Gómez BL, Theodoro RC, de Hoog S, Engelthaler DM, Zancopé-Oliveira RM, Felipe MS, Barker BM. (2016) Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(6):e0004732.
119. Theel ES, Harring JA, Dababneh AS, Rollins LO, Bestrom JE, Jespersen DJ. (2015) Reevaluation of commercial reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in urine. *J Clin Microbiol.* 53(4):1198-203.
120. Toranzo AI, Tiraboschi IN, Fernández N, Ibarra-Camou B, Rivas MC, Lee W, Davel G, Canteros CE. (2009) Molecular diagnosis of human histoplasmosis in whole blood samples. *Rev Argent Microbiol.* 41(1):20-6.
121. van Gelderen de Komaid A, Duán EL, Madero AM, Carizo V. (1992) Histoplasmosis in northwestern Argentina. Epidemiological survey of Chuscha and La Higuera in the province of Tucumán. *Eur J Epidemiol.* 8(2):206-10.
122. van Gelderen de Komaid A, Durán E, Borges de Kestelman I. (1999) Histoplasmosis and Paracoccidioidomycosis in northwestern Argentina III. Epidemiological survey in Vipos, La Toma, and Choromoro - Trancas, Tucumán, Argentina. *Eur J Epidemiol.* 15(4):383-8.
123. Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. (1986) Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms.

- J Bacteriol. 165(3): 813-8.
124. Weinberg M, Weeks J, Lance-Parker S, Traeger M, Wiersma S, Phan Q, Dennison D, MacDonald P, Lindsley M, Guarner J, Connolly P, Cetron M, Hajjeh R. (2003) Severe histoplasmosis in travelers to Nicaragua. *Emerg Infect Dis.* 9(10):1322-5.
 125. Wheat J, French ML, Kamel S, Tewari RP. (1986) Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J Clin Microbiol.* 23(3):493-9.
 126. Wheat J. (1995) Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. *Clin Microbiol Rev.* 8(1):146-59.
 127. Wheat J, Wheat H, Connolly P, Kleiman M, Supparatpinyo K, Nelson K, Bradsher R, Restrepo A. (1997) Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis.* 24(6):1169-71.
 128. Wheat LJ, Kauffman CA. (2003) Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 17:1-19.
 129. Wolff M. (1999) Outbreak of acute histoplasmosis in Chilean travelers to the ecuatorian jungle: an example of geographic medicine. *Rev Med Chil.* 127(11):1359-64.
 130. Zancopé-Oliveira RM, Morais e Silva Tavares P, Muniz MM. (2005) Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 45(3):443-9.
 131. Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. (2006) *Histoplasma capsulatum* with aberrant morphology isolated in Argentina *Rev Argent Microbiol.* 38(2):79-83.