

**Desarrollo y evaluación de una técnica de  
PCR en tiempo real para detectar ADN de  
*Histoplasma capsulatum* en muestras  
clínicas**

Tesis para optar al grado de magister

***Bioquímica Adriana Inés TORANZO***

Realizado en: Servicio Micosis Profundas, Departamento Micología. Instituto  
Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	
Generalidades	4
Áreas endémicas	5
Fisiopatogenia y formas clínicas de la enfermedad	6
Diagnóstico	9
2. OBJETIVO GENERAL	19
3. OBJETIVOS PARTICULARES	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
Muestras de ADN	20
Población de estudio	23
Extracción de ADN de muestras clínicas	24
Diseño y estandarización de la PCR en tiempo real	25
Límite de detección	27
Especificidad analítica	27
PCR anidada	30
Controles	31
Evaluación de Resultados	32
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSIÓN	48
7. CONCLUSIONES	54
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

## RESUMEN

### Desarrollo y evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para detectar ADN de *Histoplasma capsulatum* en muestras clínicas

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, es el agente etiológico de la histoplasmosis (HP), una enfermedad subaguda o crónica, endémica en Argentina.

Los objetivos de este trabajo fueron: (i) desarrollar una PCR en tiempo real para amplificar un fragmento del ITS1 (internal transcribed spacer) específico de *H. capsulatum*, (ii) evaluar su utilidad para el diagnóstico de HP en muestras de sangre, y (iii) comparar los parámetros de valoración de la PCR en tiempo real con los de una PCR anidada (gen *HcP100* específico de *H. capsulatum*), utilizada en nuestro laboratorio para diagnóstico de HP.

Se definió como caso de HP al paciente que tuvo un cultivo positivo y/o una serología positiva para *H. capsulatum*, o hallazgos histopatológicos (levaduras intracelulares y granuloma) consistentes con la presencia del hongo.

La técnica de PCR en tiempo real se estandarizó con un sistema TaqMan<sup>®</sup> utilizando como blanco un fragmento del ITS1 específico de *H. capsulatum*. Se calculó el límite de detección utilizando diferentes concentraciones de muestras de ADN de *H. capsulatum* y la especificidad frente a ADNs de especies fúngicas diferentes de *H. capsulatum* y de varias micobacterias. El límite de detección de la prueba fue 50 fg y la especificidad analítica 98,11%.

Se analizaron muestras clínicas (sangre y otros materiales) obtenidas de 176 pacientes entre enero de 2010 y diciembre de 2013: 85 pacientes tenían HP y 91 tenían enfermedades que por sus características clínicas requerían un diagnóstico diferencial de HP. En 151 de estos pacientes (77 casos de HP y 74 sin HP) se analizó al menos una muestra de sangre, y en 25 pacientes se contó con otros materiales clínicos pero no con sangre (8 con HP y 17 sin HP).

Para evaluar la sangre como muestra de elección en el diagnóstico de HP, se compararon los parámetros: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), en muestras de sangre *versus* todos los materiales clínicos disponibles del paciente (incluido sangre). Esta comparación mostró que la S diagnóstica de la PCR en tiempo real aumentó significativamente (de 71% a 84%  $p < 0,05$ ), así como el VPN (de 76% a 86%  $p < 0,05$ ), cuando se consideraron los resultados de todos los materiales clínicos disponibles. Por su parte la E y el VPP no mostraron diferencias significativas al analizar solamente sangre *versus* todos los materiales clínicos disponibles.

La PCR en tiempo real resultó menos sensible (71% y 84% en sangre y todos los materiales clínicos disponibles, respectivamente) que la PCR anidada (84% y 94% en sangre y todos los materiales clínicos disponibles, respectivamente). Ambas PCRs fueron específicas (>91%) y presentaron VPP elevado (> 90%) independientemente de si se analizó solamente sangre o todos los materiales clínicos disponibles.

Las técnicas de PCR son sensibles y específicas para detectar ADN de *H. capsulatum* en muestras clínicas con muy buenos valores predictivos para el diagnóstico de HP. Siempre que sea posible, se recomienda analizar, además de muestras de sangre, todas las muestras clínicas disponibles del paciente para aumentar la eficiencia del diagnóstico. Hasta el momento los resultados de PCR deben ser confirmados por técnicas microbiológicas que siguen siendo las definitivas para el diagnóstico de HP.

**ABSTRACT****Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples.**

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is the etiologic agent of histoplasmosis (HP), a subacute or chronic mycosis which is endemic in Argentina.

The aims of this work were: (i) to develop a real-time PCR assay to amplify a *H. capsulatum* specific ITS1 (internal transcribed spacer) fragment, (ii) to evaluate the utility of this real time PCR assay for the diagnosis of HP in blood samples, and (iii) to compare the efficiency of real time PCR with that of a nested PCR (*H. capsulatum* specific gene *HcP 100*) previously implemented, and currently in use in our laboratory for diagnostic purposes.

A HP case was defined by positive results of culture and /or serum test positive for *H. capsulatum*, or histopathological findings (intracellular yeast and granulome) consistent for *H. capsulatum*.

The real time PCR assay was standardized with the TaqMan<sup>®</sup> system addressing the ITS1 region of *H. capsulatum* as specific target. The limit of detection was determined using serial dilutions of *H. capsulatum* DNA samples. The specificity was calculated using DNAs of fungal species different from *H. capsulatum* and DNA from several mycobacteria. The lower limit of detection was 50 fg and the analytical specificity was 98.11%.

We analyzed clinical specimen obtained from 176 patients between January 2010 and December 2013. Of these, 85 were HP cases and 91 presented any of several clinical conditions requiring a HP differential diagnosis. At least one blood sample was available from 151 of these patients (77 HP cases, 74 without HP). Clinical specimens other than blood were available from the remaining 25 patients (8 HP cases, 17 without HP).

Diagnostic accuracy was measured using the following parameters: diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). The performance of the real time PCR assay when applied to blood specimens alone was compared with performance when applied to any specimen (including blood). The real time PCR showed significantly higher diagnostic sensitivity (84% versus 71%,  $p < 0.05$ ), and NPV (86% versus 76%,  $p < 0.05$ ) when tested on blood plus other clinical specimen than when tested on blood specimens alone. The diagnostic specificity and the PPV showed no significant variation when adding specimens other than blood.

The real time PCR assay was less sensitive (71% and 84% for blood and blood plus other specimen type, respectively) than the nested PCR (84% and 94% for blood and blood plus other specimen type, respectively). Both PCRs were fairly specific ( $> 91\%$ ) and the PPV was high ( $> 90\%$ ) regardless of clinical specimen type.

PCR assays are sensitive and specific for the detection of *H. capsulatum* in clinical specimens and have good predictive values for the diagnosis of HP. Whenever possible, we suggest to analyze all the clinical specimens available from every patient, in addition to blood samples, to maximize the diagnostic efficiency. However, molecular techniques must be confirmed by conventional microbiology, which remains the gold standard for HP diagnosis.

## 1.-INTRODUCCIÓN

### GENERALIDADES

*Histoplasma capsulatum*, es el agente etiológico de la histoplasmosis, una enfermedad subaguda o crónica de distribución mundial [Arenas, 2008]. Se conocen tres variedades taxonómicas de *H. capsulatum*, que difieren en algunas características fenotípicas, en las áreas endémicas y en los hospederos susceptibles. *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, endémico de África, es causante de infección en humanos y más raramente en animales. *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, endémico de Asia y África, es el agente de la linfangitis equina. Por último, *H. capsulatum* var. *capsulatum* es el agente de la “**histoplasmosis capsulati**”, enfermedad endémica en toda América donde se han documentados casos en el hombre y otros mamíferos entre los paralelos 57° Norte [Burek-Huntington *et al.*, 2014] y 38° Sur [Calanni *et al.*, 2013], y actualmente se considera de distribución mundial puesto que se han detectado casos en el resto del mundo, la mayoría en pacientes que emigraron y/o visitaron áreas endémicas y otros que posiblemente adquirieron la infección localmente [Ashbee *et al.*, 2008; Chakrabarti & Slavin, 2011, Gugnani, 2000; McLeod *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2013]

El hongo desarrolla a 25-28 °C en la naturaleza e *in vitro* en forma micelial multicelular (fase micelial - M), mientras que *in vivo* en los tejidos de los hospederos naturales como *in vitro* a 37 °C desarrolla su forma unicelular (fase levaduriforme - L) [Arenas, 2008].

Actualmente, con base en las secuencias parciales del DNA de cuatro genes, se describieron ocho poblaciones genéticas o clados asociados al origen geográfico del hongo, siete de los cuales fueron propuestos como especies filogenéticas diferentes. Esta clasificación incluyó 137 cepas de orígenes geográficos diversos y las tres variedades taxonómicas del hongo, destacando seis de la var. *duboisii* y 13 de la var. *farciminosum*.

Las siete especies filogenéticas reconocidas al momento son: Norte América clase 1 (**NAm 1**), Norte América clase 2 (**NAm 2**), Latinoamérica grupo A (**LAm A**), Latinoamérica grupo B (**LAm B**), **Australia**, **Holanda-Indonesia** y **África** [[Kasuga et al., 1999](#); [2003](#)].

## ÁREAS ENDÉMICAS

El primer caso de histoplasmosis ocurrió en un individuo de Martinica que trabajaba en la construcción del canal de Panamá y fue documentado por Samuel Taylor Darling en 1906 [[Kwon-Chung & Bennett, 1992](#)]. A partir de este ocurrieron numerosos casos, muchos de ellos asociados a brotes en EEUU, México, países de Centroamérica y en el norte de Sudamérica.

Actualmente, la histoplasmosis es considerada de distribución mundial y se describen casos en Europa, en Australia, en África y Asia.

Las zonas de mayor endemicidad son las de los valles de los ríos Mississippi y Ohio en EEUU, en América Central (México, Panamá, Honduras, Guatemala y Nicaragua), el Caribe (Jamaica, Puerto Rico, Cuba y Martinica) y América del Sur (Venezuela, Guyana Francesa, Colombia, Perú, Brasil y Argentina).

**En Argentina** la principal área endémica es la región geográfica conocida como Pampa Húmeda [[Rubinstein & Negroni, 1981](#)] y se estima que existen aproximadamente ocho millones de individuos infectados por *H. capsulatum* [[Negroni R, comunicación personal](#)].

Diferentes estudios han detectado individuos reactivos a la histoplasmina en diferentes regiones del país. Los porcentajes de infección varían entre 5-78%, según el grupo etario y la región geográfica [[Canteros et al., 2004](#); [Rubinstein & Negroni, 1981](#)].

Hasta la emergencia del SIDA, la forma predominante en la Argentina era la **diseminada crónica**, localizada comúnmente en piel y mucosas orofaringolaríngeas. Esta forma aún se presenta en pacientes mayores de 45 años sin aparente inmunocompromiso. En este tipo de

pacientes es la segunda micosis endémica en frecuencia después de la paracoccidiodomicosis [Canteros *et al.*, 2004]. A partir del primer caso asociado a SIDA descrito en 1983 [Negroni *et al.*, 1990], la incidencia de histoplasmosis en pacientes con inmunocompromiso aumentó drásticamente [Negroni *et al.*, 1994]. El índice de prevalencia de la enfermedad fue estimado entre 0.5-1.0 por cada 1000 personas infectadas [Bava, 1995]. Datos recientes obtenidos de la Red Nacional de Laboratorios de Micología (RNLM) de Argentina ubican a la histoplasmosis como la primera micosis endémica en frecuencia y la cuarta micosis sistémica en las encuestas epidemiológicas realizadas en 2004 y 2008 [Davel & Canteros, 2007; Davel *et al.*, 2010].

## **FISIOPATOGENIA Y FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD**

El hombre y otros mamíferos se infectan por la inhalación de microconidios y pequeños fragmentos de hifas aerosolizados en el ambiente, asociados a cúmulos de excretas de aves y de murciélagos [Huhn *et al.*, 2005, Kwon-Chung & Bennett, 1992].

Los eventos que suceden a la infección en humanos y otros mamíferos dependen de factores inherentes tanto al hospedero como al microorganismo. Algunos investigadores [Gildea *et al.*, 2005; Newman, 2005] proponen que una vez que el hongo ingresa al hospedero llegan a macrófagos de los alvéolos y 6 horas después se realiza el proceso de transformación dimórfica y posterior multiplicación iniciándose de esta manera la infección. Sin embargo, recientes estudios proponen que los primeros eventos de fagocitosis y de diseminación se podrían producir a partir de la primera interacción de las estructuras fúngicas con los tejidos de las vías respiratorias superiores, particularmente con la mucosa nasal y el NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissues) donde se produciría la transición M-L para luego producirse la diseminación a otros órganos [Suárez -Álvarez *et al.*, 2005].

Los eventos que siguen a la primoinfección están asociados al estado inmune de los hospederos. En individuos inmunocompetentes expuestos a bajas concentraciones de conidios infectivos de *H. capsulatum* se resuelve la infección sin mayores consecuencias. En la mayoría de los casos esta primoinfección pasa inadvertida y menos del 5% de los individuos expuestos al hongo desarrollan sintomatología similar a la de un resfriado común [Goodwin *et al.*, 1981; Cano & Hajjeh, 2001]. En cambio, si el hospedero expuesto tiene algún grado de compromiso del sistema inmune, es más probable que la infección progrese [McKinsey *et al.*, 1997; Negroni *et al.*, 1991; Retallack & Woods, 1999; Wheat, 1996; Woods, 2002], por lo que la enfermedad puede estar asociada a distintos grados de inmunocompromiso. Cuando el paciente presenta un inmunocompromiso grave, puede ocurrir un cuadro de sepsis que incluye fiebre, pérdida de masa corporal y hepatoesplenomegalia [Graybill, 1998; Negroni *et al.*, 1991; Wheat, 1996]. Estos pacientes frecuentemente presentan enfermedades o condiciones debilitantes del sistema inmune, como el SIDA, enfermedades autoinmunes, neoplasias, diabetes, neuropatías, nefropatías, trasplantes y otras patologías que requieren tratamientos con inmunodepresores. En otras situaciones la enfermedad puede ser adquirida sin causa aparente de inmunocompromiso o inmunocompromiso leve, tales como exposición a inóculos masivos, estrés psíquico, senilidad, etilismo, tabaquismo y asma, entre otros.

El espectro de formas clínicas de la enfermedad ha sido sujeto de distintas propuestas de clasificación. Una de ellas es la propuesta por Negroni y Negroni [Rubinstein & Negroni, 1981]. Cuando los individuos se exponen a concentraciones masivas de elementos infecciosos pueden desarrollar una infección respiratoria aguda denominada **histoplasmosis pulmonar primaria**, la que se presenta con fiebre, tos no productiva y mal estado general. En estos pacientes, una rápida y exacerbada respuesta inflamatoria es la causa fundamental de la sintomatología pulmonar. Esta forma clínica ha ocurrido con



frecuencia en **brotos epidémicos** en Estados Unidos (EE.UU.), México (MX) y Centroamérica [Chamany *et al.*, 2004; García-Vásquez, 2005; Huhn *et al.*, 2005; Schlech *et al.*, 1983; Stobierski *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2005; Velazco-Castrejón, 1998; Waldman *et al.*, 1983]. La misma puede derivar a formas diseminadas que comprometen seriamente la vida del paciente.

Recientemente se ha comenzado a detectar brotes epidémicos al sur del paralelo 34° [Calanni *et al.*, 2013; Negroni *et al.*, 2010] y al norte del paralelo 54° [Anderson *et al.*, 2006].

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 [Graybill, 1998; Porta & Maresca, 2000]. Es por esta causa que, pacientes que alguna vez habitaron y/o visitaron áreas endémicas de histoplasmosis pueden manifestar la enfermedad mucho tiempo después de la exposición y en países donde ésta es exótica.

La **forma diseminada aguda o subaguda**, sea a consecuencia de infección reciente o de reactivación endógena, ocurre en general asociada a pacientes inmunocomprometidos graves donde el microorganismo actúa como un oportunista.

Otra presentación es la **histoplasmosis pulmonar crónica**, clínicamente indistinguible de la tuberculosis avanzada del adulto, enfermedad a la que puede asociarse [Negroni *et al.*, 1991].

La forma **diseminada crónica** es de evolución lenta y se caracteriza por lesiones granulomatosas localizadas comúnmente en mucosas y parénquima pulmonar, hepático y esplénico. Si no es tratada a tiempo, puede producir lesiones irreversibles e incluso llevar a la muerte del individuo [Negroni *et al.*, 1991].

En Argentina, a diferencia de centro y norte América, las lesiones mucocutáneas son las

más frecuentes tanto en las formas diseminadas agudas como crónicas. En un hospital de la ciudad de Buenos Aires, Negroni *et al.*, [1994] encontraron este tipo de lesiones en 42 de 53 casos de histoplasmosis asociada a SIDA, diagnosticados entre 1983 y 1992. Más recientemente, en un hospital del interior del país, Pietrobon *et al.*, [2004] también describieron lesiones mucocutáneas en una alta proporción de pacientes con histoplasmosis y SIDA (12:16).

## DIAGNÓSTICO

**Examen Directo.** El examen directo con la coloración de Giemsa permite observar levaduras intracelulares coloreadas en forma de casquete compatibles con *H. capsulatum*. Éstas levaduras también pueden observarse con otras tinciones histológicas como Grocott y PAS. En los pacientes que presentan lesiones muco-cutáneas, el diagnóstico puede realizarse rápidamente por la observación microscópica de las levaduras en frotis o biopsias de las lesiones. Si las lesiones en piel o en mucosas están ausentes son necesarios otros especímenes clínicos, que requieren de técnicas invasoras para su obtención, como lo son el lavado broncoalveolar (LBA) y/o biopsias quirúrgicas. En cualquiera de los materiales que se analizan por ésta metodología la sensibilidad del diagnóstico directo es limitada por la calidad del espécimen clínico y por la observación que debe ser realizada por un profesional experimentado y con práctica en microscopía. La sensibilidad de la citopatología es muy variable con valores que oscilan entre el 17 y 70% [Hage & Wheat, 2010].

**Cultivo e identificación microbiológica.** El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento y la identificación del hongo en medios de cultivo a partir de los mismos materiales clínicos utilizados para el examen directo. Además, se puede recurrir a muestras de sangre entera, que pueden ser procesadas por el método de la lisis y centrifugación, el

que posee entre 57 y 90% de sensibilidad [Bianchi *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2007].

La sensibilidad del cultivo depende del material., en médula ósea *H. capsulatum* se aísla con frecuencia entre un 70 y un 90%, mientras que en muestras respiratorias los aislamientos positivos poseen una frecuencia entre el 50 y 90% [Goodwin, 1981].

La identificación de *H. capsulatum* requiere la demostración microscópica de estructuras morfológicas típicas de la especie como la presencia de microconidias y macroconidias tuberculadas en cultivos a 25-28 °C; la conversión de la fase M a fase L en cultivos a 37 °C o en tejido de animales experimentalmente infectados, y la producción de exoantígenos. Macroscópicamente, las colonias en general son algodonosas o pulverulentas con color variable del blanco al pardo oscuro [Kauffman, 2008]. Estos procedimientos son lentos debido al tiempo prolongado que requiere *H. capsulatum* para desarrollarse tanto *in vitro* como *in vivo* [Ibarra-Camou *et al.*, 2011]. Asimismo, la existencia de morfologías atípicas de la especie ha sido referida por diferentes autores [Lacaz *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1986; Sandin *et al.*, 1993; Zuiani *et al.*, 2006], e incluso sus conidios pueden confundirse morfológicamente con algunos producidos por hongos no patógenos pertenecientes a otros géneros, tales como *Chrysosporium*, *Sepedonium* y *Renispora* [Ibarra-Camou *et al.*, 2011]. El proceso de conversión *in vitro* de la fase M a la fase L es variable y laborioso, requiere con frecuencia de múltiples subcultivos y no siempre es exitoso [Ibarra-Camou *et al.*, 2011]. La conversión *in vivo* en animales, demanda procedimientos éticos para el manejo de animales de laboratorio y de una infraestructura especializada para el uso experimental de patógenos tipo III [CDC, 2009]. Los exoantígenos del hongo [Standard & Kaufman, 1976], se obtienen tanto de la fase M como de la fase L y los más característicos son los denominados antígenos H y M. La presencia de estos exoantígenos, es una excelente herramienta para la identificación, aunque el trabajar con ellos requiere experiencia y tiempos prolongados de incubación para su obtención [Ibarra-Camou *et al.*, 2011], además

de contar con laboratorios de nivel de bioseguridad tipo III como se mencionó anteriormente [CDC, 2009].

**Cultivo e Identificación molecular.** Las pruebas de laboratorio que se usan para identificar *H. capsulatum*, presentan como principal dificultad los tiempos necesarios para que el hongo forme estructuras que permitan identificarlo y el riesgo que implica la manipulación de los cultivos.

Un avance importante en la identificación molecular de *H. capsulatum* fue la implementación del AccuProbe *Histoplasma* (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA) [Hall *et al.*, 1992]; este método permite identificar *H. capsulatum* a partir de cultivos, sin embargo, a pesar de su sensibilidad se informaron reacciones con resultados falsos positivos con algunas especies de *Chrysosporium* [Brandt *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 1992], con *Nocardia asteroides* e inclusive con la sangre de carnero que se utiliza para los medios de cultivo [Stockman *et al.*, 1993]. Pero el principal inconveniente de la sonda quimioluminiscente es que posee una baja vida media (seis meses), y el instrumental necesario para la lectura de la reacción posee un elevado costo [Huffnagle *et al.*, 1993].

Recientemente, se comenzaron a desarrollar diferentes variantes de la técnica de PCR para la identificación de *H. capsulatum*. Martagon-Villamil *et al.*, [2003] trabajaron sobre lisados de cultivos sin purificar utilizando una PCR en tiempo real basada en blancos de las regiones ITS con una sensibilidad y especificidad del 100%.

Autores como de Matos-Guedes *et al.*, [2003] desarrollaron dos técnicas independientes de PCR para la identificación de *H. capsulatum* basadas en la secuencia de nucleótidos del antígeno M. La especificidad de los primers fue confirmada por la ausencia total de productos de amplificación de ADN genómico de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida* spp., *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*. Este ensayo rápido,

sensible y específico se propuso como una manera fácil de identificar los aislamientos típicos y atípicos de *H. capsulatum*.

Pounder *et al.*, [2006] probaron el DiversiLab Mold Kit (bioMérieux SA) para identificar diferentes especies de hongos dimórficos, pero los resultados no fueron concluyentes para identificar *H. capsulatum* debido a los perfiles heterogéneos obtenidos para esta especie.

Recientemente, Ibarra-Camou *et al.*, [2011] analizaron 248 cepas de *H. capsulatum* y 68 de otras especies fúngicas con el método descrito por de Matos-Guedes *et al.*, [2003], utilizando como templado de la reacción un lisado acuoso obtenido por tres ciclos de hervido/enfriamiento rápido a 0 °C. Solo dos cepas de *Emmonsia crescens* presentaron reacción cruzada con la PCR. El tiempo total de la prueba no superó las 7 h con un 96% de sensibilidad, 97% de especificidad y un valor predictivo positivo del 99%. El método es rápido y económico y puede ser utilizado como una alternativa para identificar presuntamente *H. capsulatum* en lisados de cultivo sin necesidad de purificar la cepa.

**Inmunodiagnóstico.** Existen diversas pruebas inmunológicas útiles para el diagnóstico de la histoplasmosis. Su sensibilidad y utilidad dependen de la forma clínica de la enfermedad, del tiempo de evolución y del estado inmunológico del paciente. Éstos métodos son más rápidos que el cultivo.

Las pruebas desarrolladas para detectar anticuerpos son: la inmunodifusión en gel-agar (ID), la de fijación de complemento (FC), el western blot (WB) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

La técnica más aplicada para la búsqueda de anticuerpos es la ID para detectar los antígenos H y M específicos de especie. La prueba posee una sensibilidad que varía entre el 70 y 100% y una especificidad del 100%, que dependen a su vez de la forma clínica y de la condición inmunológica del paciente. La FC es más sensible y menos específica (60 a 90%) y está cayendo en desuso por su complejidad [Guimarães *et al.*, 2006].

Otra técnica utilizada en la búsqueda de anticuerpos es el WB, el que ha demostrado ser un método rápido, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de histoplasmosis pulmonar aguda cuando se utilizan los antígenos H y M desglicosilados [Pizzini *et al.*, 1999]. Estos antígenos fueron posteriormente utilizados en pruebas de ELISA, técnica que mostró tener una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 96% y 95%, respectivamente [Guimarães *et al.*, 2006]. Ambas pruebas demostraron su capacidad de detectar anticuerpos antes que las precipitinas pudieran ser detectadas por la técnica de ID; esto las convierte en una buena herramienta para el diagnóstico de las formas pulmonares agudas; sin embargo, los antígenos desglicosilados no están disponibles comercialmente y éstas técnicas artesanales son difíciles de implementar y estandarizar.

Por su parte, los anticuerpos requieren al menos 15-20 días pos-exposición inicial al patógeno para ser detectables y un hospedero inmunológicamente competente. La detección de estos anticuerpos encuentran su máxima aplicación en las formas crónicas de la histoplasmosis [Canteros *et al.*, 2004].

La detección de antígenos presenta su mayor aplicación en los casos de histoplasmosis pulmonar primaria [Swartzentruber *et al.*, 2009] y en histoplasmosis diseminada asociada a pacientes inmunocomprometidos [Gutierrez, 2008]. La determinación de antígenos se realiza en fluidos biológicos (antígenos circulantes) o en tejidos infectados, es el método de inmunodiagnóstico más rápido; sin embargo, puede presentar reacciones cruzadas con antígenos similares de otros hongos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* y *Blastomyces dermatitidis* [Hage & Wheat, 2010]. Un estudio realizado en pacientes de diversos brotes epidémicos demostró que la combinación de las pruebas de antigenemia, antigenuria y la detección de anticuerpos mediante la FC ofrece un método sensible y no invasivo para el diagnóstico de histoplasmosis pulmonar aguda

[Swartzentruber *et al.*, 2009].

**Diagnóstico molecular sobre muestras clínicas.** La PCR es la prueba molecular más utilizada en el diagnóstico de la histoplasmosis puesto que detecta pequeñas cantidades de DNA fúngico presente en las muestras clínicas. Las técnicas de PCR adquirieron relevancia debido a la notable reducción en el tiempo de diagnóstico que se traduce en una mejora en la supervivencia de los pacientes con histoplasmosis por la rápida implementación de las terapias adecuadas. Además, la disminución del riesgo biológico para el personal de laboratorio, permitiría 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 *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2010; Toranzo *et al.*, 2009]. En la Tabla 1.1 se resumen las técnicas moleculares utilizadas para la detección de ADN de *H. capsulatum* en diferentes materiales clínicos.

La PCR para *H. capsulatum* se ha desarrollado en diferentes modalidades: en un sólo paso (PCR convencional), semi-anidada, anidada, tiempo real y otras modalidades [Frías De León *et al.*, 2007].

Los primeros estudios con técnicas de PCR aplicadas al diagnóstico fueron realizados utilizando dos técnicas de PCR anidada. Los primers diseñados fueron: (a) para una región específica de *H. capsulatum* de la secuencia que codifica para la proteína co-activadora de 100 kDa (*HcP 100*), y (b) para el gen que codifica la región 18S del RNA ribosomal [Bialek *et al.*, 2002]. Ambas PCRs fueron ensayadas utilizando muestras de biopsias incluidas 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 [Toranzo *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2010]. Posteriormente, se comparó la sensibilidad de la PCR anidada basada en el gen *HcP100* con diversas tinciones en muestras de corte histológicos. La PCR anidada identificó inequívocamente *H. capsulatum* en los tejidos y aunque superó a las tinciones histológicas, no demostró ser significativamente más sensible que la tinción de Grocott [Bialek *et al.*, 2002].

En el 2003, Bracca *et al.*, [2003] desarrollaron una PCR semi-anidada utilizando primers que amplificaban 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 levadura y no presentó reacción cruzada contra otros patógenos bacterianos o fúngicos. Sin embargo, el número de muestras clínicas analizadas en este estudio fue bajo, y posteriormente la PCR no fue reproducida por otros autores para validar su utilización en el diagnóstico.

La técnica molecular más evaluada en el diagnóstico de histoplasmosis por PCR anidada es la basada en la secuencia del gen *HcP100*. Maubon *et al.*, [2007] evaluaron 40 muestras provenientes de 21 casos de histoplasmosis diseminada diagnosticados en Cayena, Guayana Francesa. La prueba demostró una sensibilidad y especificidad del 100%, confirmando su potencialidad en el diagnóstico rápido de la histoplasmosis. Recientemente, Muñoz *et al.*, [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 DNA extraído de cultivos de diferentes microorganismos, con una sensibilidad del 100% y especificidades del 92.4 y 95.2%. El éxito del marcador *HcP 100* para confirmar el diagnóstico presuntivo de histoplasmosis humana, también fue probado exitosamente para el diagnóstico de la micosis en animales [Espinosa-Avilés *et al.*, 2008; Reyes-Montes *et al.*, 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 DNA fúngico alcanzando valores de sensibilidad del 89% y de especificidad del 96% para el diagnóstico de la micosis [Toranzo *et al.*, 2009].

Ohno *et al.*, [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.

Particularmente, la PCR anidada requiere una serie de cuidados en el manejo del material para evitar la contaminación con amplicones que pueden ser la causa de resultados falsos positivos. Estos amplicones se eliminan del ambiente de trabajo con irradiación de luz ultravioleta (UV), durante la extracción y antes de agregar los templados a la mezcla de reacción. En los laboratorios, se deben tomar precauciones para evitar contaminaciones, tales como realizar las mezclas en áreas del laboratorio apartadas de donde se realiza la reacción en sí. El agregado del templado de la primera y segunda PCR se debe realizar en cabinas o laboratorios independientes previamente irradiados con luz UV. Hasta ahora,

estos cuidados dificultan la transferencia del método a los laboratorios asistenciales [Toranzo *et al.*, 2009].

Frias de León *et al.*, [2012] desarrollaron dos marcadores SCAR a partir de una banda de 1200-bp, 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 una PCR convencional en 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*, sin embargo, el marcador SCAR 1281-1283 (220) fue el más específico. Recientemente, este marcador fue evaluado en un estudio multicéntrico frente a panel de diferentes concentraciones de ADN, con un bajo resultado de sensibilidad (43%) y una especificidad del 100% [Buitrago *et al.*, 2013].

Buitrago *et al.*, [2006] desarrollaron una PCR en tiempo real para detectar *H. capsulatum* utilizando oligonucleótidos diseñados con base en la región ITS1 del gen rRNA. La prueba fue realizada en muestras de suero de pacientes infectados por el VIH con histoplasmosis probada. Esta prueba fue reproducible y específica con un 70% de sensibilidad y 100% de especificidad; y con un límite de detección de 1 fg de DNA genómico por microlitro de muestra. En un nuevo trabajo, estos autores [Buitrago *et al.*, 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 recientemente realizado en Guyana 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 *et al.*, 2010].

En la Tabla 1.1 se resumen los métodos de PCR utilizados para el diagnóstico de histoplasmosis.

**Tabla 1.1.** Genes blanco, sensibilidad y especificidad de las pruebas moleculares utilizadas para detección de ADN de *Histoplasma capsulatum*.

Secuencia blanco	Tipo de PCR	Sensibilidad	Especificidad	Tipo de muestra utilizada	Referencia
18 rRNA	Anidada	89	77	Biopsias: T-FFPE	Bialek <i>et al.</i> , 2002
Proteína de 100-kDa (Hc100)	Anidada	69-100	90-100	Biopsias: T-FFPE Biopsias frescas Muestras respiratorias: LBA, LB, esputo LCR Sangre total	Bialek <i>et al.</i> , 2002 Rickerts <i>et al.</i> , 2002 Maubon <i>et al.</i> , 2007 Toranzo <i>et al.</i> , 2009 Muñoz <i>et al.</i> , 2010
Antígeno H	Semi-anidada	ND	ND	Biopsias frescas Sangre total Raspado de piel	Bracca <i>et al.</i> , 2003
Antígeno M	Anidada	ND	ND	Muestras respiratorias: LBA, T-FFPE LCR Suero	Matos Guedes <i>et al.</i> , 2003 Ohno <i>et al.</i> , 2013
ITS1 rDNA	Tiempo real	78-100	100	Secreciones respiratorias Medula ósea Suero	Buitrago <i>et al.</i> , 2006 Buitrago <i>et al.</i> , 2007
ITS rRNA	Tiempo real	95	96	LBA Biopsias frescas Sangre total Medula ósea LCR	Simón <i>et al.</i> , 2010
SCAR 1281-1283(220)	Un paso	43	100	36 muestras clínicas 20 ambientales	Frías de León <i>et al.</i> , 2012 Buitrago <i>et al.</i> , 2013

LBA: lavado broncoalveolar; LB: lavado bronquial; LCR: líquido cefalorraquídeo T-FFPE: tejidos fijados y embebidos en parafina

Previamente, en nuestro laboratorio utilizando una PCR anidada que amplifica un fragmento del gen *HcP100*, se analizó la eficiencia del diagnóstico molecular frente a los métodos de diagnóstico convencional [Toranzo *et al.*, 2009]. Sin embargo, debido a que la PCR anidada es más susceptible a contaminaciones y requiere mayor complejidad nos propusimos desarrollar una PCR en tiempo real y analizar las ventajas y desventajas de la misma en comparación con la PCR anidada en la población que requiere diagnóstico de histoplasmosis.

## 2.- OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar una PCR en tiempo real para detectar ADN de *Histoplasma capsulatum*, evaluar su uso en sangre como material de elección para el diagnóstico de HP y comparar su eficiencia con una PCR anidada previamente estandarizada y utilizada en nuestro laboratorio para diagnosticar histoplasmosis.

## 3.-OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar los primers y sondas con base en la secuencia ITS de *Histoplasma capsulatum* depositada en GenBank para su utilización en una PCR en tiempo real.
2. Adecuar la PCR en tiempo real a las condiciones de nuestro laboratorio utilizando un sistema TaqMan®.
3. Calcular el límite de detección de ADN de *H. capsulatum* y la especificidad analítica de la PCR frente a ADN de diferentes especies fúngicas y de micobacterias.
4. Evaluar controles de inhibición.
5. Comparar la eficiencia de la PCR en tiempo real para diagnosticar histoplasmosis cuando se utiliza sangre como único material clínico y cuando se analizan todos los materiales clínicos disponibles de los paciente incluyendo sangre.
6. Comparar la eficiencia de la PCR en tiempo real con una técnica de PCR anidada que amplifica el gen *HcP100* utilizada actualmente en nuestro laboratorio para diagnóstico de histoplasmosis.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS DE ADN

#### ADN de hongos dimórficos

Se utilizaron ácidos nucleicos de los hongos dimórficos: *H. capsulatum* (10 cepas), *Coccidioides* sp. (cinco cepas), *Paracoccidioides brasiliensis* (tres cepas) y *Blastomyces dermatitidis* (una cepa). Las cepas fueron manipuladas en el laboratorio de nivel de seguridad 3 (BSL3) de la UOCCB-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” siguiendo las normativas de bioseguridad recomendadas por los Centros de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC), EE.UU., para el manejo de estos patógenos [CDC, 2009]. Cada una de estas cepas fue subcultivada en agar Sabouraud (ASG) (glucosa 2%, peptona 1%, agar 1.5%) para la extracción de ADN como se detalla posteriormente. Estos microorganismos están depositados en la Colección de Cultivos del Departamento Micología (DMIC), INEI, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

#### Extracción y purificación de ADN de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y de *P. brasiliensis*.

A partir de un subcultivo en ASG a 37 °C de entre 7 y 10 días, se efectuaron subcultivos en caldo GYE (glucosa 2%, extracto de levadura 1%) que se mantuvieron durante 84 h en agitación orbital (120 rpm) a 37 °C hasta obtener abundante cantidad de levaduras libres. La extracción se realizó utilizando la técnica modificada previamente utilizada en nuestro laboratorio [Zuiani *et al.*, 2006].

Brevemente, se centrifugó el caldo de cultivo a 2000 x g, se separó el pellet de levaduras, y se lavó con 1,5 ml de buffer TE (Tris HCl 0,1 M; EDTA 10 mM, pH 8; Ditiotreitól 10 mM). Se centrifugó a 3000 x g, se eliminó el sobrenadante, se agregó igual volumen de

perlas de vidrio y 0,5 ml de buffer TE con SDS 2%. Se agitó en vórtex durante 15 segundos para romper las células y se lo colocó el mismo tiempo en hielo. Esta operación se repitió 10 veces. Luego se agregó 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma, P-2308, MO, USA) y se incubó a 55 °C por 1h. Se agregó 140 µl CINa 5M y 65 µl CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio al 10%) y se incubó a 65 °C por 10 min con agitación periódica. Para extraer el ADN se agregó aproximadamente un volumen de cloroformo ( $\cong$  700 µl), se agitó por inversión, se incubó 30 min en hielo y se centrifugó 10 min a 20000 x g. Se recuperó la fase acuosa y se agregó igual volumen ( $\cong$  700 µl) de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1), se agitó y se centrifugó 10 min a 20000 x g. Sobre la fase acuosa se repitió el procedimiento con cloroformo. El ADN se precipitó agregando a la fase acuosa 0,5 volúmenes de isopropanol frío ( $\cong$  500 µl) se agitó y dejó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó 20000 x g y el precipitado se secó en baño termostático seco a 55 °C. El ADN se resuspendió en 100 µl de buffer TE (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

El ADN se purificó agregando 10 µl de RNAsa (Sigma, R6513) (1mg/ml) y 25 µl de proteinasa K (0,2 mg/ml), incubando cada uno de los tratamientos durante 1 h a 37 °C. Luego se agregó H<sub>2</sub>O bidestilada hasta un volumen de 400 µl y se agregó 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico. Se agitó y se centrifugó 20 min a 20000 x g. La fase acuosa se separó, se le agregó NaCl 5 M y se incubó 15 min en hielo. El ADN se precipitó agregando 1 ml de alcohol 70% y se dejó toda la noche a -20 °C. Finalmente se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 100 µl de buffer TE.

### **Extracción y purificación de ADN *Coccidioides* spp.**

Se utilizó el método descrito previamente por [Canteros et al., 2009](#). Brevemente, las esférulas obtenidas en el medio de Converse a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10% fueron inactivadas con thiomersal 1%, lavadas con alcohol 70° y posteriormente con agua

bidestilada. El paquete de células fúngicas se separó por centrifugación a 8000 x g por 10 min. La extracción y purificación del ADN se realizó siguiendo el protocolo del equipo comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), previo tratamiento con 200 U de liticasa (Sigma, L4025-50KU) por 2 h a 30 °C. El precipitado se secó a 55 °C y se resuspendió en 100 µl de buffer TE.

La calidad y cantidad de los ADN fúngicos fueron analizadas realizando una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X (40 mM TRIZMA base, 110 mM ácido acético glacial y 0,001N EDTA, pH 8.0), durante 1 h a 100 Voltios y posterior teñido con bromuro de etidio 10 mg/ml durante 30 min. Se incluyó en un carril un marcador de masa (Mass Ruler). La integridad del ADN se verificó visualmente y la cuantificación se realizó en forma relativa frente al marcador de masa.

Los ADN cuantificados se diluyeron aproximadamente hasta 10 ng/µL en TE y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

#### **ADN de hongos patógenos oportunistas**

Los ADN de: *Cryptococcus neoformans* (n= 5), *Candida* spp. (n=12), *Paecilomyces lilacinus* (n=1), *Emmonsia* sp. (n=2) y *Aspergillus* spp. (n=5) fueron cedidos por los Laboratorios de Levaduras y de Hongos Miceliales del Departamento Micología. Las cepas de donde fueron obtenidos estos ácidos nucleicos también están depositadas en la colección de cultivos DMIC.

#### **ADN de Micobacterias**

Los ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (n=4), *M. avium* (n=4) *M. intracelulare* (n=4) *M. kansasii* (n=2) *M. bovis* (n=1) *M. peregrinum* (n=1), *M. fortuitum* (n=1), *M. simeae* (n=1) y *M. chelonae* (n=1) fueron gentilmente cedidos por el Servicio Micobacterias del



Departamento Bacteriología del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

## **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Entre enero de 2010 y hasta diciembre de 2013 se analizaron muestras clínicas de 176 pacientes derivadas al Departamento de Micología para diagnóstico de histoplasmosis. Se definió como caso de histoplasmosis a los individuos que tuvieron un cultivo positivo y/o una serología positiva para *H. capsulatum*, o hallazgos histopatológicos de levaduras intracelulares y granuloma consistentes con el hongo [parámetro según recomendaciones del EORT/MSG Consensus Group . [De Pauw B *et al.*, 2008].

Las muestras de los pacientes fueron registradas con un número para proteger la identidad de los mismos y la confidencialidad de los resultados.

Se analizaron muestras clínicas de:

- **85 pacientes CON HISTOPLASMOSIS**

37 solo con muestras de sangre entera

40 con sangre y otros materiales diversos

8 solo con muestras diferentes de sangre

Estos pacientes tuvieron un cuadro clínico compatible con histoplasmosis, el examen microscópico de tejido y/o el cultivo fue positivo para *H. capsulatum* y/o la inmunodifusión positiva observándose banda de identidad.

- **91 pacientes SIN HISTOPLASMOSIS.** Pacientes con patologías respiratoria, lesiones mucocutaneas o placas radiográficas y antecedentes epidemiológicos que requerían diagnóstico diferencial de histoplasmosis.

64 solo con muestras de sangre entera

10 con sangre y otros materiales diversos

17 solo con muestras diferentes de sangre

En este grupo de pacientes los estudios de laboratorio confirmaron otra patología, o bien los estudios microbiológicos clásicos no pudieron confirmar el diagnóstico de histoplasmosis.

- 150 muestras de sangre entera de igual cantidad de personas sanas sin ninguna sintomatología que aceptaron voluntariamente ser incluidas en el estudio.

## EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS CLÍNICAS

Para extraer ADN de todas las muestras procesadas se utilizó el pre-tratamiento enzimático descrito en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio [Toranzo *et al.*, 2009]

Las muestras de **sangre y de MO** fueron recolectadas en un tubo conteniendo EDTA-K3, y el volumen mínimo requerido fue de 2,5 ml. Las muestras fueron mantenidas entre 4 y 7 °C hasta la extracción del ADN (nunca congelar). Brevemente, la sangre/MO de cada tubo se centrifugó a 2500 x g durante 10 min a 54 °C y se eliminó el plasma. El paquete celular, lavado dos veces con buffer TE, fue sometido a un pre-tratamiento con enzimas: 10 µl de liticasa (12.500 U/ml) (Sigma L-4025-50KU) y 100 µl de enzima lisante de *Trichoderma harzianum* (6µg/µl) (Sigma L1412-56) en 300 µl buffer sorbitol (1.2M sorbitol, 10mM Cl<sub>2</sub>Ca, 0,1M Tris/ClH pH 8, 35 mM beta-mercaptoetanol) durante 2 h a 25 °C y posteriormente, con 500 µl solución de lisis (500 mM EDTA pH=8, 1% [p/v] N-laurylsarcosina (Sigma L-5125) y 15 µl proteinasa K (20mg/ml) (Sigma), por 2 h a 55 °C y 18 h a 37 °C.

Luego, se realizó la extracción de ADN con fenol- cloroformo- alcohol isoamílico, se precipitó con isopropanol y finalmente se resuspendió en 100 µl de buffer TE.

Las muestras de **LCR y materiales de origen respiratorio** (esputo, líquido pleural,

lavados bronquiales y BAL) de los cuales se dispusieron de volúmenes entre 1,5 y 5 ml, fueron centrifugadas. La extracción se realizó a partir del pellet pre-tratado como se describió anteriormente para muestras de sangre.

Las muestras de **biopsia** fueron procesadas tomando una porción de las mismas y luego se le realizó el pre- tratamiento enzimático. Las **biopsias de tejidos fijados e incluidos en parafina (T-FFPE)** se cortaron con micrótopo a 3 µm de espesor, se colectaron los cortes en tubos Eppendorf y luego se desparafinaron con un lavado con xileno y dos lavados con etanol absoluto. Posteriormente, se centrifugaron y el precipitado una vez seco se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE y se le realizó el pre-tratamiento como se describió anteriormente.

Las muestras **improntadas sobre portaobjetos** (coloreados o no), fueron raspadas con bisturí estéril y recogidas en un tubo tipo Eppendorf con agua destilada estéril, posteriormente, centrifugadas y lavadas con buffer TE y sometidas al pre-tratamiento como se describió anteriormente.

El DNA fúngico de estos tres últimos grupos de muestras se extrajeron utilizando el equipo comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemania)

## **DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR en tiempo real**

### **Diseño de los primers y sondas para PCR en tiempo real**

Los primers y la sonda fueron diseñados con base en la región ITS1 del rRNA de la secuencia depositada en el GenBank AB055231.2 para un sistema TaqMan<sup>®</sup>. La región ITS1 fue previamente utilizada en un sistema de sondas FRET por otros investigadores [Buitrago *et al.*, 2007]. Para el diseño se utilizó el programa Primer Express<sup>®</sup> Software versión 3.0. (Applied Biosystems).

## **Estandarización de PCR en tiempo real**

### **Reacción SYBR<sup>®</sup> Green**

El reactivo SYBR<sup>®</sup> Green (PerfeCTa SYBR<sup>®</sup> Green SuperMix, UNG, LOW ROX, QUANTA 95070-100, MD) se utilizó primeramente para evaluar los primers diseñados. La reacción de PCR se estandarizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para un volumen final de 25 µl se utilizó: 12.5 µl de la mezcla de reactivo SYBR<sup>®</sup> Green 2x (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, AccuStart Taq DNA Polymerase, UNG, SYBR<sup>®</sup> Green I dye, ROX Reference Dye, y estabilizadores, 580-885 nm excitation), 1.25 µl de cada primer (10 µM) y 5 µl de ADN de *H. capsulatum* (10 ng/µl). El protocolo de amplificación utilizado fue: 2 min a 50 °C; 10 min 95 °C, 50 ciclos 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 1 ciclo de 15 s a 95°, 1 min a 60°, 15 s a 95° para obtener la curva de disociación utilizando un termociclador Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, CA).

### **Sistema TaqMan<sup>®</sup>**

Una vez evaluados los primers se probó la sonda HcITS-162, con los reactivos TaqMan<sup>®</sup>. Para ello se utilizó la mezcla Perfecta<sup>™</sup> qPCR SuperMix, UNG, Low ROX (Quanta Biosciences, MD). Para un volumen final de 25 µl se utilizó: 12,5 µl de la mezcla Perfecta<sup>™</sup> 1x (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, AccuStart Taq DNA Polymerase, UNG, ROX Reference Dye y estabilizadores, 580-885 nm excitación), 1,25 µl de cada primer (10 µM), 0,50 µl de sonda (10 µM) y 5 µL de ADN de *H. capsulatum* (10 ng/µl). El protocolo de amplificación fue: 2 min a 50 °C; 10 min 95 °C, 50 ciclos 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, utilizando un termociclador Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, CA).

Los ensayos con los reactivos SYBR<sup>®</sup> Green y TaqMan<sup>®</sup> se realizaron por triplicado, utilizando ADN de 10 cepas diferentes de *H. capsulatum*. Como controles negativos de

reacción se utilizó agua destilada.

Para determinar la positividad/negatividad de cada reacción se analizó visualmente las curvas sigmoideas.

## **LÍMITE DE DETECCIÓN**

### **El límite de detección de ADN**

Se utilizó ADN genómico de tres cepas de *H. capsulatum* (DMIC 002324, DMIC 114094 y DMIC 124047). Se realizaron diluciones seriadas en factor 10 a partir de 500 ng/μl hasta 0,05 fg/μl (valores no detectables) y se realizó el ensayo con sistema TaqMan® descrito anteriormente, utilizando como templado cada una de las diluciones. Se realizaron tres ensayos independientes y por triplicado.

En cada ensayo se analizaron las curvas sigmoideas de variación de la fluorescencia normalizada ( $\Delta R_n$ ) en función de los ciclos para determinar el umbral (Thr). Luego se realizó un gráfico de Ct en función de los logaritmos de diferentes concentraciones de ADN para conocer los rangos de Ct para cada concentración. Sobre el mismo gráfico se trazó la curva de regresión lineal con los Ct promedios para cada concentración de ADN.

## **ESPECIFICIDAD ANALÍTICA**

La especificidad analítica se determinó analizando el ADN de las especies fúngicas diferentes de *H. capsulatum* y micobacterias. Para ello se realizó la PCR en tiempo real con 20 μl de mezcla de reacción y 5 μl de ADN de cada especie.

**La especificidad analítica** se calculó como el número de ADN de especies diferentes de *H. capsulatum* que dieron PCR negativa (verdaderos negativos, VN) dividido en el número de ADN de especies diferentes de *H. capsulatum* que dieron PCR negativa (VN) más el número de ADN de especies fúngicas diferentes de *H. capsulatum* que dieron PCR positiva

(falsos positivos, FP).

$$\text{Especificidad analítica} = \frac{\text{VN} \times 100}{\text{VN} + \text{FP}}$$

Los ensayos se realizaron por triplicado para cada ADN.

### PCR ANIDADA

Se realizó como se describe en un trabajo previo de nuestro laboratorio. Se utilizaron los primers diseñados por Bialek *et al.*, basados en la secuencia de ADN que codifica para la proteína de 100 kDa involucrada en el proceso de infección y supervivencia del hongo dentro de la célula del hospedero. Los primers externos Hc I (5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3') y Hc II (5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3') delimitan una secuencia de 391 pb. Los primers internos Hc III (5'- GAC ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3') y Hc IV (5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3') delimitan una secuencia de 210 pb.

La PCR se estandarizó a las condiciones de nuestro laboratorio con leves modificaciones del protocolo original. Para un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  se utilizó 2 mM  $\text{ClMg}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1 U *Taq* polimerasa (Invitrogen, Tech-line Life, CA, EE.UU.), 0,1% de albúmina bovina fracción V (Sigma), 1  $\mu\text{M}$  de primers HcI y HcII y 2  $\mu\text{l}$  de muestra extraída. El programa de amplificación usado fue 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C 5 min. Con 2  $\mu\text{l}$  del producto de la primera amplificación se realizó la segunda PCR (anidada), donde se disminuyó  $\text{ClMg}_2$  a 1 mM en la mezcla y se utilizaron los primers Hc III y Hc IV a una concentración 1  $\mu\text{M}$ . El programa de amplificación de la PCR anidada fue 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s, 67 °C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C 5 min. Las reacciones se realizaron en

un termociclador iCycler (BioRad, CA, EE.UU.). Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 2% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ ml) y fotodocumentados (BioRad Gel Doc 1000, CA, EE.UU.). Como estándar de pares de bases se utilizó 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

## CONTROLES

### **Evaluación de los controles de amplificación para PCR en tiempo real.**

#### *Control interno*

Se probaron los primers que amplifican el gen *18s rRNA* (Fw 5'GGGAATCAGGGTTCGATTCC 3' y Rv 5'GCCTCGAAAGAGTCCTGTATTGTTA 3') con la reacción de SYBR® Green. La prueba se realizó utilizando ADN extraído de 40 muestras de tejidos humanos y de otros animales con y sin histoplasmosis. Las muestras humanas fueron: 21 de sangre entera y 2 biopsias (hepática y de piel). Los tejidos animales fueron de 17 murciélagos (7 hígados, 6 bazos y 4 pulmones).

La reacción se realizó con 12.5 µl del reactivo SYBR® Green, 1 µl de cada primer a una concentración 10 µM y 5 µL de ADN para un volumen final de 25 µL. El protocolo de amplificación fue realizado como se indica en ESTANDARIZACIÓN DE PCR en tiempo real/Reactivo SYBR® Green.

Esta reacción debería ser siempre positiva. Cuando el resultado fuere negativo para este gen control, las muestras deben ser diluidas en factor 2 hasta 1:4 para diluir los inhibidores que puedan estar presentes y volver a realizar la reacción.

### **Control externo**

Se realizaron dos diluciones en factor 2 en agua bidestilada de las 40 muestras previamente ensayadas. Esta dilución minimiza los inhibidores que puedan estar presentes en las muestras. La última dilución (1/4) se utilizó como templado de control de amplificación de la reacción adicionándole 1 µl ADN de *H. capsulatum* para controlar la presencia de inhibidores. Esta reacción debe ser siempre positiva.

### **Criterios de aceptación y rechazo de los ensayos**

Ambas técnicas de PCR fueron realizadas con sus respectivos controles en la población de estudio.

- a) **Control negativo de extracción (solo para las muestras de sangre)** sangre sin levaduras, cuyo resultado de PCR debe ser siempre negativo.
- b) **Control positivo de extracción (solo para las muestras de sangre)** sangre con  $10^6$  levaduras de *H. capsulatum*, cuyo resultado de PCR debe ser siempre positivo.
- c) **Control de inhibición:** se utilizó el “control externo”, para ambas PCR como se detalla en ítem “**Evaluación de los controles de amplificación para PCR en tiempo real**”
- d) **Control negativo de PCR:** un tubo con mezcla de reacción de PCR con agua.
- e) **Curva de cuantificación para PCR en tiempo real :** tres tubos con mezcla de reacción cada una con  $10^2$  fg  $10^4$  y  $10^6$  fg/ µL de ADN de *H. capsulatum*.

### **EVALUACIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados de las PCRs de diferentes muestras fueron ingresadas a una planilla realizada “*ad hoc*” en el programa Excel.

Para realizar la valoración de la prueba en el diagnóstico de la histoplasmosis se realizaron



los análisis de sensibilidad y especificidad diagnóstica y los valores predictivos. Solo se consideraron pacientes con histoplasmosis confirmada aquellos que tenían un examen directo y/o cultivo positivo y/o serología positiva.

Se realizó una tabla de 2x2 con los resultados de los pacientes con histoplasmosis confirmada *versus* pacientes con otras patologías diagnosticadas diferentes de histoplasmosis e individuos sanos. Las tablas 2x2 se realizaron para PCR en tiempo real y PCR anidada en forma independiente como se muestra en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Relación entre el resultado de la PCR y la presencia o ausencia de histoplasmosis. Tabla 2x2.

Resultado de la PCR	Diagnóstico de	
	histoplasmosis	sin histoplasmosis*
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

\*Individuos sanos y pacientes con evidencia de otro diagnóstico diferente a histoplasmosis.

Con esta tabla se calculó la **sensibilidad diagnóstica** (la capacidad del test para detectar ADN de *H. capsulatum* por ende, detectar enfermedad) y **especificidad diagnóstica** (probabilidad de clasificar correctamente a un individuo en el que no se detecta ADN de *H. capsulatum*).

Para ello se utilizaron las siguientes fórmulas.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \quad \text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos; FN: falsos negativos; FP: falsos positivos

Para conocer la probabilidad de que el paciente esté realmente con histoplasmosis o no, se realizaron los cálculos de valores predictivos.

El valor predictivo positivo (VPP) se calculó como la proporción de pacientes con un resultado positivo en la PCR que finalmente resultaron estar enfermos y el porcentaje nos indicaría que probabilidad existe de que el paciente con PCR positiva tenga histoplasmosis.

El valor predictivo negativo (VPN) se estimó dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la PCR y el valor indicaría que probabilidad existe de que el paciente con PCR negativa no tenga histoplasmosis.

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \qquad \text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}}$$

VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos; FN: falsos negativos; FP: falsos positivos

Los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica y los valores predictivos, se compararon utilizando el programa MEDCALC® Ver 11.3.3.0.

Los pacientes con probable histoplasmosis fueron analizados independientemente y solo de una forma descriptiva. En estos pacientes el diagnóstico no se pudo confirmar por estudios microbiológicos clásicos.

## 5.- RESULTADOS

### DISEÑO DE LOS PRIMERS Y SONDAS PARA PCR en tiempo real

Los primers elegidos fueron: HcITS-57F 5'-ACCCTTGTCTACCGGACCTGTT-3', y HcITS-212-R 5'-TTTTGACTGGATTATTATCGCTCTCA-3' que amplificaban una región de 154 pb. La sonda fue HcITS-162 5'FAM- CGGTGAACGATTGGCGTCTGAGC-TAMRA3' (Figura 5.1). En la Figura 3.1 se indica la ubicación de los primers y sonda elegidos en la secuencia ITS. Los primers flanquean un segmento del ITS1.

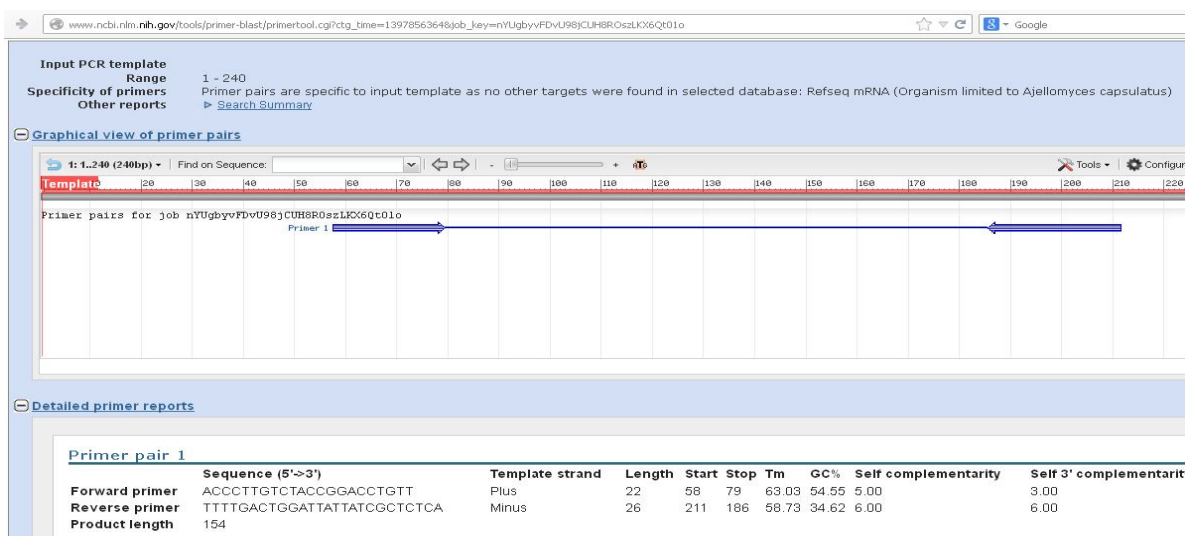
```

1  cacgccgtgg ggggctggga gcctctgacc gggaccccc cgcccccta cccggccacc
61  cttgtctacc ggacctgtg cctcgccggg cctgcagcga tgctgccggg ggagcttctc
121 ctccccgggc ccgtgtccgc cggggacacc gcaagaaccg tcggngaacg attggcgtct
181 gagcatgaga gcgataataa tccagtcaaa actttcaaca acggatctct tggttccgac
241 atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa gtaatgtgaa ttgcagaatt ccgtgaatca
301 tcgaatcttt gaacgcacat tgcgccccct ggtattccgg ggggcatgcc tgccgagcg
361 tcattgcaac cctcaagcgc ggcttgtgtg ttgggccatc gtccccctc gaccggcggg
421 acgtgcccgga aatgcagtgg cgtgtctgag ttccggtgcc cgagcgtatg gggctttgcc

```

**Figura 5.1.** Secuencia del gen ITS número de acceso GenBank AB055231.2. Se indican las secuencias de los primers HcITS-57F y HcITS-212R, que flanquean el fragmento amplificado por la PCR-RT (154 pb), y la secuencia de la sonda HcITS-162.

Una vez diseñados los primers y sonda se realizó un análisis en BLAST en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) para corroborar si la región amplificada es específica de *H. capsulatum* (Fig. 5.2).



**Figura 5.2.** Evaluación de los primers en el programa BLAST

Los resultados demostraron la especificidad de los mismos para ITS de *Ajellomyces capsulatus*

### ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR en tiempo real

La PCR con reactivo SYBR<sup>®</sup> Green amplificó los 10 ADN de *H. capsulatum* analizados y no se observó amplificación en los tubos donde no se agregó ADN del hongo (mezcla de reacción más agua destilada). La temperatura de disociación (T<sub>m</sub>) fue de 87 °C.

Una vez comprobado que los primers amplifican el fragmento buscado se procedió a incluir la sonda TaqMan<sup>®</sup> para realizar la PCR en tiempo real.

### CONTROL DE AMPLIFICACIÓN

En la tabla 5.1 se resumen los resultados de la evaluación de controles de amplificación. Cuando se evaluó el gen *18S rRNA* como control interno de amplificación sólo 8 de las 21 (38%) muestras de sangre humana probadas fueron positivas para éste. Por otra parte de las 19 muestras de tejidos de mamíferos evaluadas, 17 fueron positivas (89%).

Cuando se evaluó el control externo este fue 100% efectivo tanto para sangre como para muestras de tejido.

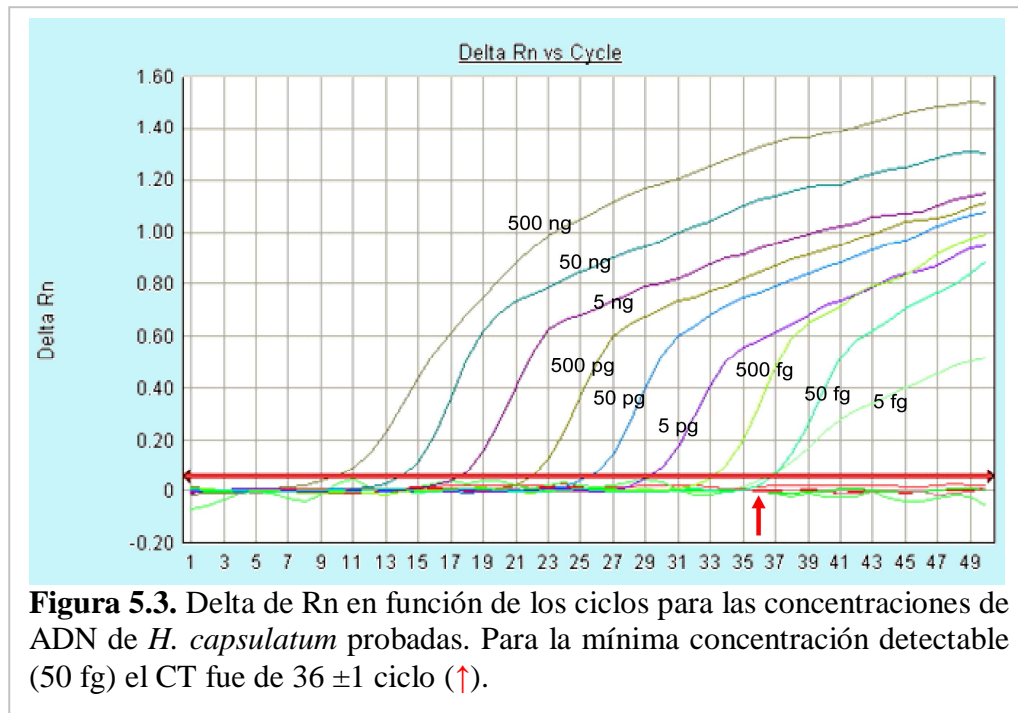
Tabla 5.1. Evaluación del control de amplificación:

	Muestras analizadas	HP-	HP+	PCR en tiempo real (+)	CONTROLES	
					Interno 18s rRNA	Externo
					PCR + (%)	PCR + (%)
Sangre entera humanos	21	18	3	3	8 (38)	21 (100%)
Tejidos animales	17	10	7	7	15 (88)	17 (100%)
Tejidos humanos	2	1	1	-	2	2

HP- muestras de pacientes y/o animales sin histoplasmosis, HP + muestras de pacientes y/o animales con histoplasmosis.

## LIMITE DE DETECCIÓN

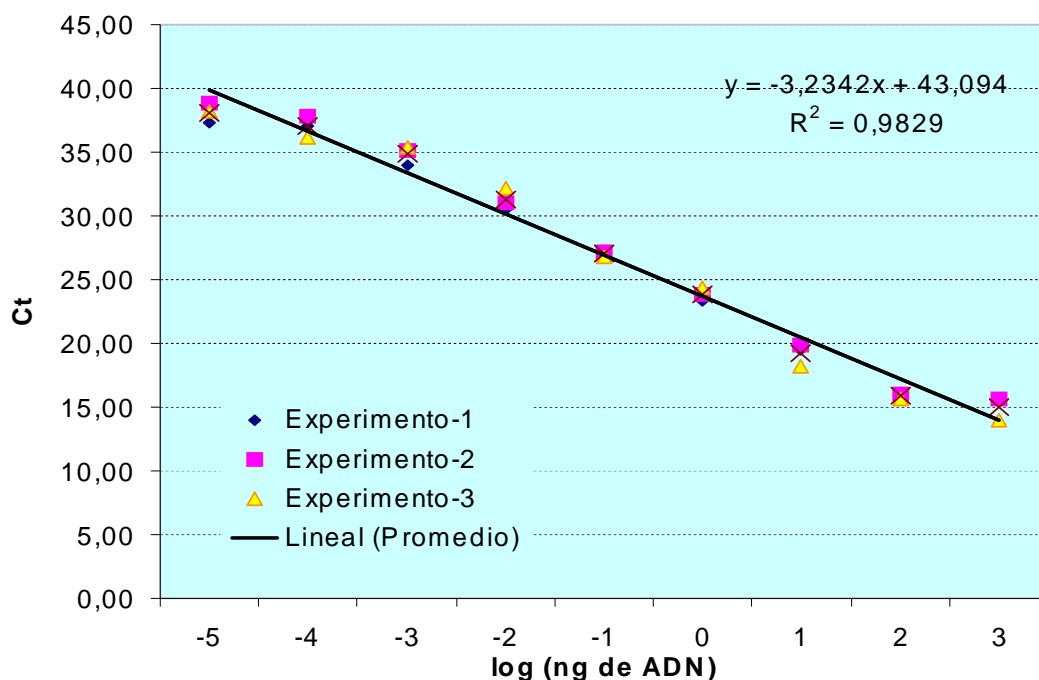
En la Figura 5.3 se observa el gráfico de  $\Delta R_n$  en función del número de ciclos de PCR para diferentes concentraciones de ADN de *H. capsulatum*.



**Figura 5.3.** Delta de Rn en función de los ciclos para las concentraciones de ADN de *H. capsulatum* probadas. Para la mínima concentración detectable (50 fg) el CT fue de  $36 \pm 1$  ciclo (↑).

La **cantidad mínima de ADN purificado** de *H. capsulatum* donde se detectó una variación de fluorescencia fue de 50 fg de ADN con un 100% de reproducibilidad en tres experiencias independientes; cada una por triplicado y donde la mezcla fue realizada por dos operadores diferentes.

Para conocer los rangos de detección para distintas concentraciones de ADN se realizó una curva de regresión lineal de Ct en función del log de la concentración de ADN genómico purificado (regresión lineal). Se calcularon los rangos de Ct correspondientes a cada concentración de ADN probada con un intervalo de confianza del 95% (Figura 5.4).



**Figura 5.4** Ct en función del log de la concentración de ADN expresada en ng. La menor cantidad de ADN detectado fue de 50 fg. En algunos casos se pudo detectar hasta 5 fg.

## ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

En la Tabla 5.2 se muestran los resultados de PCR en tiempo real de los ADN de las diferentes especies de microorganismos probados.

**Tabla 5.2** ADN de especies analizadas

ADN de especies analizadas	N	Resultado de la PCR
<i>Coccidioides sp.</i>	5	Negativo
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3	Negativo
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1	Negativo
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	Negativo
<i>Candida spp.</i>	12	Negativo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	Negativo
<i>Emmonsia crecens</i> (DMIC 062869)	2	Positivo
<i>Emmonsia crecens</i> (DMIC 083308)	2	Negativo
<i>Aspergillus spp.</i>	5	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4	Negativo
<i>M. avium</i>	4	Negativo
<i>M. intracelulare</i>	4	Negativo
<i>M. kansasii</i>	2	Negativo
<i>M. bovis</i>	1	Negativo
<i>M. peregrinum</i>	1	Negativo
<i>M. fortuitum</i>	1	Negativo
<i>M. simeae</i>	1	Negativo
<i>M. chelonae</i>	1	Negativo

$$\text{Especificidad analítica \%} = \frac{52 \times 100}{52 + 1} = 98,11\%$$

La especificidad analítica calculada fue de 98.11 %. Se observó amplificación del ADN de una *Emmonsia crescens* cepa DMIC 062869.

### ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS

El resumen de los resultados de las PCR de los 85 pacientes con diagnóstico de certeza de histoplasmosis fueron consignados en la Tabla 5.3.

La población con histoplasmosis fue: 51 (60%) de género masculino y 34 (40%) femenino. El promedio de edad de la población afectada fue de 40,5 años y la mediana de 41 años. El 70,6% (60/85) de pacientes tenían una causa de inmunodeficiencia documentada, mientras que en los restantes no se determinó ninguna causa de inmunocompromiso. La principal causa de inmunocompromiso fue la coinfección con HIV 28,2% (n=24).

En los 77 pacientes con histoplasmosis confirmada, de los que se analizaron muestras de sangre, 55 fueron positivas por PCR en tiempo real y 65 por PCR anidada.

De las muestras de sangre de 12 pacientes en las que no se obtuvo amplificación del ADN fúngico por ninguna de las dos técnicas de PCR, en 9 casos fue posible analizar otro espécimen clínico, 8 de éstos tuvieron ADN amplificable por alguna de las técnicas en el material clínico extra analizado y el restante fue negativo (PAC 401). En los restantes 3 pacientes solo se contó con una muestra de sangre (PAC 123,178 y 195) (Tabla 5.3).

Cabe señalar que en 18 pacientes se analizaron muestras improntadas sobre un portaobjeto (MIP), en 15 (83,3%) de estas muestras se detectó ADN de *H. capsulatum* por PCR anidada y en 14 (77,8%) por PCR en tiempo real.

En 10 pacientes se analizaron muestras de T-FFPE, en 9 (90,0%) de estos pacientes se detectó ADN de *H. capsulatum* por PCR anidada y en 7 (70,0%) por PCR en tiempo real.

En una de las tres muestras negativas por PCR tiempo real, se detectó presencia de inhibidores (PAC 128).

En 8 pacientes no se analizaron muestras de sangre, en un caso ninguna de las dos técnicas de PCR pudo detectar ADN de *H. capsulatum* (PAC 219), a pesar que en el examen directo informado por el laboratorio de origen observaron levaduras intracelulares compatibles con el hongo. En otros dos pacientes (PAC 196 y 223) sólo se detectó ADN con la PCR anidada.



**Tabla 5.3** Pacientes con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis

Paciente identificación	Materiales analizados		Datos del paciente			PCR en sangre		PCR en otro material			
	Sangre (n)	Otros (n)	Edad	Género	Causa de IC	Anidada	T-real	Origen Clínico	material	Anidada	T-real
109	1		40	F	ND	+	-				
118	1		59	F	ND	+	+				
123	1		68	M	TC	-	-				
139	1		41	M	Insuf. renal	+	+				
141	1		28	M	HIV (+)	+	+				
142	1		38	M	HIV (+)	+	+				
146	1		53	F	ND	+	+				
147	1		15	M	ID-Hiper IgE	+	+				
151	1		36	M	HIV (+)	+	+				
152	1		39	F	HIV (+)	+	+				
155	1		45	F	HIV (+)	+	-				
160	1		46	F	HIV (+)	+	+				
165	1		16	F	HIV (+)	+	+				
178	1		37	M	HIV (+)	-	-				
195	1		37	M	HIV (+)	-	-				
198	1		33	M	HIV (+)	+	+				
213	1		44	M	HIV (+)	+	+				
215	1		50	M	trasplantado	+	+				
216	1		65	M	ND	+	+				
218	1		45	M	ND	+	+				
228	1		31	M	HIV (+)	+	+				
238	1		47	M	hidrocefalia	+	+				
260	1		16	M	ND	+	+				
269	1		53	F	ND	+	+				
272	1		58	M	ND	+	-				
346	1		55	F	HIV (+)	+	+				
370	1		40	M	LLA	+	+				
372	1		56	M	ND	+	-				
387	1		18	M	ND	+	+				
388	1		40	M	Enf. Autoimn	+	+				
424	1		37	M	ND	+	+				
112/144	2*		41	M	Granuloma laringe	+/-	-/-				
380/390	2*		3	F	neutropenia	+	+				
292/350	2*		79	F	ND	+	+				
438/451	2*		11	F	IC	+/+	+/+				
158,161,170	12#		3	F	trasplantado	+	+				
445	1		47	F	ND	+	+				
128, 129	1	1	13	F	LLA	+	-	otro	T-FFPE	+	-i
150	1	1	30	M	HIV (+)	+	+	hígado	Bx	+	+
180, 188	1	1	60	M	TC	-	-	MC	MIP	+	+
182, 185	1	1	10	M	ID	-	-	MR	MR	+	+
199	1	1	40	M	ND	+	-	MC	Bx	+	+
212	1	1	47	F	HIV (+)	-	-	MR	MR	+	+
224	1	1	52	F	ND	+	+	hueso	Bx	-	-
241	1	1	30	M	hidrocefalia	-	-	SNC	LCR	+	+
264	1	1	40	M	Enf. Crohn	+	-	MO	MO	+	+
266/267	1	1	20	M	LLA	+	-	MC	MIP	+	-
280/390	1	1	1,5	F	Insuf. Hep.	+	+	MO	MO	+	+
317	1	1	51	F	LES	+	+	MC	MIP	+	+

Tabla 5.3 (continuación)

Paciente identificación	Materiales analizados		Datos del paciente			PCR en sangre		PCR en otro material			
	Sangre (n)	Otros (n)	Edad	Género	Causa de IC	Anidada	T-real	Origen clínico	material	Anidada	T-real
367	1	1	6	F	trasplantado	+	+	duodeno	T-FFPE	+	+
401	1	1	43	F	ND	-	-	MC	MIP	-	-
414/437	1	1	10	M	LLA	+	+	SNC /LCR		+	+
417	1	1	50	F	AR	+	+	MC	MIP	+	+
425	1	1	72	F	TC	+	+	MC	Bx	+	+
434/443	1	1	51	F	TC	+	+	MC	MIP	+	+
175/192/194	1	2	70	M	Meningitis	-	-	SNC	LCR/ T-FFPE	+/+	+/+
210	1	2	45	M	ND	+	+	MR	BAL/LB	+/+	+/+
214/265	1	2	66	M	ND	+	+	MR	MIP (x2)	+/+	+/+
297/322/343	1	2	54	M	LES	+	-	MC	Bx/MIP	+/+	+/+
355/448	1	2	11	F	trasplantado	+	+	Ganglio/ MR	T-FFPE /BAL	+/+	+/+
357	1	2	43	M	TC	+	+	MC	MIP (x2)	+/+	+/+
181/183/191	1	3	27	F	ND	+	+	MC/MO	MIP (x2) /MO	+/+/-	+/+/-
379/382/393	1	8*X	44	M	HIV (+)/ hidrocefalia	-	-	SNC/MR	LCR /BAL	+/-	+/-
159/167	2*	1	42	M	HIV (+)	+/+	+/-	MC	Bx	+	+
200/237	2*	1	76	F	TC	+	+	MO	MO	+	+
262/278	2*	1	67	M	trasplantado	-	-	otro	Vál. aorta	+	+
119/125	2*	2*	15	F	meningitis	+	+	SNC	LCR	-/-	-/-
190/209	2*	2*	70	M	ND	-	-	MC	Bx / MIP	+/+	+/+
226/232/240/245	2*	2*	60	F	AR	+/-	+/-	MC/MC	T-FFPE /MIP	-/-	-/-
295/316/364/373/385/412	2#	7#	39	F	LES	+/-	+/-	MC	MIP	+/+	+/+
111,122,164	3#	1	64	M	ND	+	+	MC	T-FFPE	+	+
376/418/426	3#	2*	47	M	Enf. Crohn	+	+	MC	MIP	+	+
169,176,184	3#	2	25	F	HIV (+)	+	+	SNC	LCR	+	-
114/116/143/156	3#	4#	38	M	HIV (+)	+	+	Hígado/ MO	T-FFPE /MO (x3)	+ /3+	+ /3+
394/411/431/436	4#	2#	36	M	trasplantado	+	+	otro	Bx	+	+
163/189/319/342/405	4#	2#	56	F	ND	+	+	Hueso/B AL	Bx/MIP	+/+	+/+
211/221/225/233/293/318/345	6#	3#	42	M	HIV (+)	+	+	SNC/ MC/MC	LCR/ MIP/MIP	-/-/+	-/-/+
135		1	44	M	HIV (+)	ND	ND	MC	Bx	+	+
196		1	40	F	ND	ND	ND	MR	Liq pleural	+	-
197		1	71	M	ND	ND	ND	hígado	T-FFPE	+	+
219		1	29	M	HIV (+)	ND	ND	MC	MIP	-	-
223		2	32	M	HIV (+)	ND	ND	MR/Ganglic	T-FFPE (x2)	+/+	-/-
365		1	25	F	HIV (+)	ND	ND	MR	MIP	+	+
271		1	63	M	ND	ND	ND	MR	T-FFPE	+	+
274		1	6	M	meningitis	ND	ND	SNC	LCR	+	+

\*Materiales clínicos que corresponden al mismo episodio. En el caso de sangre cuando se consignan dos muestras, solo se desagregan los resultados en el caso de discordancia. En el caso de otros materiales los resultados se desagregan si son discordantes o si son diferentes muestras # Materiales analizados correspondientes a episodios diferentes o a muestras remitidas para control de tratamiento. Solo se consigna resultado de primer episodio. Los resultados de pacientes donde se realizó el seguimiento en el tiempo se desglosan en la tabla 5.4.

ND: no determinado, TC: tratamiento prolongado con corticoides, LLA: leucemia linfocítica aguda, LES: lupus eritematoso sistémico, AR: artritis reumatoidea, SNC: sistema nervioso central, MC: mucocutáneo, MR: material respiratorio, T-FFPE: tejido fijado-formolado y embebido en parafina, MIP: material imprimado en portaobjeto, Bx: Biopsia, BAL: lavado broncoalveolar, LB: Lavado bronquial. En este cuadro solo se consigna el resultado de la sangre que permitió el diagnóstico. Las celdas sombreadas corresponden a pacientes donde solo se analizaron muestras diferentes de sangre. X en este paciente con hidrocefalia cuyo diagnóstico se realizó del LCR tomado de la válvula de derivación ventriculoperitoneal (SHUNT).

De los 91 pacientes sin histoplasmosis probadas que requerían diagnóstico diferencial, en ocho se obtuvo amplificación de ADN de *H. capsulatum* (Tabla 5.4). Como la histoplasmosis no pudo confirmarse por técnicas convencionales éstos 8 pacientes fueron considerados como falsos positivos en la valoración de la técnica.

**Tabla 5.4** Resultados de las técnicas de PCR en los pacientes con diagnóstico de probable histoplasmosis sin confirmación por método convencional (Falsos positivos)

Paciente identificación	Materiales analizados		Datos del paciente			PCR en sangre		PCR en otro material			
	Sangre (n)	Otros (n)	Edad	Género	Causa de IC	Anidada	Tiempo real	Origen/material	Anidada	Tiempo real	
120	1		45	M	Lesiones cutáneas HIV (+)	+	+				
270/275	2	1	37	F	PPD + TBC	+/+	+/-	MC	Escarificación ulcera	+	-
277	1		28	M	HIV (+) PCP y úlceras en paladar	+	-				
257/258	2	1	11	M	Strongiloid iosis hiper- eosinofilia	-/-	-/-	MO		+	+
441	1		60	F	ND pericarditis	+	+				
162/166	2*	1	77	M	mieloma múltiple	+/+	+/+	MR	BAL	-	-
361/366/ 378	2*	2	50	M	Transp. MO Linfoma	+/-	+/-	MR	Bx / T- FFPE	-/-	-/-
384/413/ 421/433	2#	2	64	F	Eritema nodoso	+/+	+/+	MC	MIP/ Bx	-/-	-/-

\*Materiales clínicos que corresponden al mismo episodio. En el caso de sangre cuando se consignan dos muestras, solo se desagregan los resultados en el caso de discordancia. En el caso de otros materiales los resultados se desagregan si son discordantes o si son diferentes muestras #Materiales analizados correspondientes a episodios diferentes o a muestras remitidas para control de tratamiento. ND: no determinado, LMA: leucemia mieloide aguda, NO: sin causa aparente de inmunocompromiso, MC: mucocutáneo, MR: material respiratorio, T-FFPE: tejido fijado-formolado y embebido en parafina, MIP: material impreso en portaobjeto, Bx: Biopsia. En este cuadro solo se consigna el resultado de la sangre que permitió el diagnóstico.

## PARÁMETROS DE VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS

Con el fin de evaluar el aporte de la utilización de **muestras de sangre** para diagnosticar histoplasmosis por PCR, en un primer análisis solo se valoraron 77 de los 85 pacientes con histoplasmosis confirmada y 74 de los 91 pacientes sin histoplasmosis, en los que se estudió al menos una muestra de sangre entera (n=151) (Tabla 5.5).

Al analizar los resultados de éstos 151 pacientes en 55 se detectó ADN de *H. capsulatum* por PCR en tiempo real y en 65 por PCR anidada. Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para PCR en tiempo real y anidada se muestran en la tabla 5.5.

**Tabla 5.5.** Resultados de PCR en donde se consideraron sólo 151 pacientes en los que se contó con al menos una muestra de sangre.

	Con histoplasmosis	Sin histoplasmosis	
PCR tiempo real +	55	6	61
PCR tiempo real -	22	68	<b>90</b>
	<b>77</b>	<b>74</b>	

<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>71*</b>
<b>Especificidad (%)</b>	<b>92</b>
<b>VPP (%)</b>	<b>90</b>
<b>VPN (%)</b>	<b>76</b>

	Con histoplasmosis	Sin histoplasmosis	
PCR anidada +	65	7	<b>72</b>
PCR anidada -	12	67	<b>79</b>
	<b>77</b>	<b>74</b>	

<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>84*</b>
<b>Especificidad (%)</b>	<b>91</b>
<b>VPP (%)</b>	<b>90</b>
<b>VPN (%)</b>	<b>85</b>

La diferencia de sensibilidad entre ambas PCR es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), sin embargo, la diferencia de porcentaje entre especificidad, VPP y VPN de PCR tiempo real *versus* anidada no fue significativa ( $P > 0.05$ ).

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad de las dos PCR fue significativa ( $P < 0.05$ ), cuando solo se consideró la sangre como material de diagnóstico. La especificidad, el VPP y VPN no mostraron diferencias significativas entre ambas técnicas de PCR.

Luego se analizó el **total de materiales clínicos (sangre y/u otros materiales clínicos)** de los pacientes: 85 con histoplasmosis y 91 con patologías que requerían diagnóstico diferencial (n=176) y se consideró para los parámetros de valoración los resultados de cualquiera de los materiales analizados en el paciente (Tabla 5.6).

De 85 pacientes con histoplasmosis confirmada; en 71 se pudo detectar ADN por PCR en tiempo real y en 80 por PCR anidada. Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para PCR en tiempo real y anidada, se observan en la Tabla 5.6.

**Tabla 5.6.** Resultados de PCR en donde se consideraron los 176 pacientes en muestras donde se contó con diversos tipos de muestras incluidas sangre

	Con histoplasmosis	Sin histoplasmosis	
PCR tiempo real +	71	7	<b>78</b>
PCR tiempo real -	14	84	<b>98</b>
	<b>85</b>	<b>91</b>	

<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>84*</b>
<b>Especificidad (%)</b>	<b>92</b>
<b>VPP (%)</b>	<b>91</b>
<b>VPN (%)</b>	<b>86</b>

	Con histoplasmosis	Sin histoplasmosis	
PCR anidada +	80	8	<b>88</b>
PCR anidada -	5	83	<b>88</b>
	<b>85</b>	<b>91</b>	

<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>94*</b>
<b>Especificidad (%)</b>	<b>91</b>
<b>VPP (%)</b>	<b>91</b>
<b>VPN (%)</b>	<b>94</b>

La diferencia de sensibilidad y VPN entre ambas PCR es estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), la diferencia de porcentaje de especificidad, VPP de tiempo real *versus* anidada no fue significativa ( $P > 0.05$ ).

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad y VPN de las dos PCR fue significativa ( $P < 0,05$ ). En el resto de los parámetros no se observaron diferencias significativas entre ambas técnicas de PCR.

En la tabla 5.7 se puede observar la comparación de los parámetros de valoración de la

PCR en tiempo real cuando se analiza sangre como única muestra clínica y cuando se considera el resultado de sangre y cualquier otro material analizado.

**Tabla 5.7.** Comparación de parámetros de valoración de la PCR en tiempo real en relación al uso de sangre sola o sangre y otros materiales.

	PCR en tiempo real	
	Solo muestra de sangre (n=151)	Sangre + otros materiales (n=176)
Sensibilidad (%)	71*	84*
Especificidad (%)	92	92
VPP (%)	90	91
VPN (%)	76**	86**

En la PCR en tiempo real se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los porcentajes de sensibilidad (\*) y VPN (\*\*).

La sensibilidad y VPN en la PCR en tiempo real aumentan en forma significativa ( $p < 0,05$ ) cuando, además de sangre, se incluyen otros tipos de muestra clínicos para el análisis, sin embargo, no hay diferencias en la especificidad ni en el VPP.

En cada jornada experimental se incluyó una muestra de sangre control de individuo sano. Del total de 150 muestras analizadas con este fin, ninguna mostró amplificación en ambas PCR. Estas no se consideraron en el cálculo de los parámetros de valoración de las técnicas ya que pertenecían a individuos sanos, sin cuadro clínico compatible con histoplasmosis y su inclusión en el análisis influiría de manera positiva sobre los parámetros de valoración. En algunos pacientes fue posible realizar un seguimiento utilizando ambas técnicas de PCR y estudiando sangre y/u otros materiales clínicos. En algunos llamó la atención que los resultados de las PCR se mantenían en el tiempo, o se negativizaban para posteriormente volver a dar resultado positivo (Tabla 5.8).

**Tabla 5.8** Resultados de PCRs de pacientes donde fue posible realizar seguimiento.

Paciente	Identificación	Fecha	Muestra	Origen	Anidad a	T- real	Ct
A	295	18/12/2012	sangre		+	+	32,50
			escarificación (MIP)	Ulcera de pierna	+	+	34,12
	316	30/01/2013	escarificación	Ulcera de pierna	+	+	34,00
	364	08/05/2013	MIP	Ulcera de pierna	+	-	
	373	23/05/2013	Bx	pierna	+	+	33,52
			MIP	Ulcera de pierna	+	+	34,52
	385	12/08/2013	T-FFPE	pierna	-	-	
412	02/09/2013	MIP	Ulcera de pierna	-	-		
B	111	28/01/2010	sangre		+	+	32,00
	122	01/03/2010	sangre		-	-	
	164	02/11/2010	sangre		+	+	35,00
	164 bis	15/12/2010	bx	laringe	+	-	
C	376	10/07/2013	sangre		+	+	35,82
			MIP	Lesión glúteo	+	+	33,08
	418	16/10/2013	sangre		+	+	25,78
	426	11/11/2013	sangre		+	-	
D	169	26/01/2011	sangre		+	+	34,00
	176	03/03/2011	sangre		+	+	34,00
			LCR	SNC	+	-	
	184	05/04/2011	sangre		-	-	
LCR			SNC	-	-		
E	394	06/09/2013	sangre		+	+	
			Líqu de punción	Suprarrenal	+	+	34,76
	411	08/10/2013	sangre		+	-	
	431	14/11/2013	sangre		+	-	
	436	18/11/2013	sangre		+	+	
bx			peritoneal	+	+	37,00	
F	163	03/01/2011	sangre		+	+	35,20
			bx	hueso	+	+	36,00
	189	26/04/2011	sangre		-	-	
	319	03/02/2013	sangre		-	-	
	342	01/02/2013	MIP	BAL**	+	+	35,36
405	25/09/2013	sangre		+	+	32,76	
G	211	20/07/2011	sangre		+	+	32,00
	221	29/09/2011	sangre		+	+	35,00
			LCR		-	-	
	225	06/10/2011	sangre		-	-	
	233	15/10/2011	MIP*	Mucosa nasal	-	-	
	293	28/11/2011	sangre		+	+	34,42
	318	28/01/2013	sangre		-	-	
MIP*			Ulcera nasal	+	+	33,47	
363	15/05/2013	sangre		-	-		
H	114	15/02/2010	sangre		+	+	34,00
			T-FFPE	hígado	+	+	36,00
	116	10/03/2010	MO		-	-	
	143	13/07/2010	sangre		-	-	
			MO		-	-	
156	15/11/2010	sangre		+	+	35,50	
I	158	24/11/2010	sangre		+	+	37,00
			MO		+	+	29,00
	170	11/02/2011	sangre		-	-	
	207	05/06/2011	sangre		-	-	
	222	07/10/2011	sangre		+	+	35,00
	243	11/01/2012	sangre		+	-	
	256	16/03/2012	sangre		-	-	
	279	13/09/2012	sangre		+	-	
	288	30/10/2012	sangre		-	-	
	294	18/01/2013	sangre		+	+	
	300	16/01/2013	sangre		+	+	32,48
398	18/09/2013	sangre		-	-		

T-FFPE: tejido fijado-formolado y embebido en parafina, MIP: material impregnado en portaobjeto.

## 6.- DISCUSIÓN

El diagnóstico definitivo de la histoplasmosis se debe realizar a través de la observación microscópica de levaduras intracelulares compatibles con *H. capsulatum* en los tejidos, el aislamiento del hongo y la detección de anticuerpos específicos frente a antígeno y antisuero de referencia [Muñoz *et al.*, 2010]. Con el advenimiento de las técnicas moleculares y ante la ausencia de equipos comerciales varios grupos de investigadores comenzaron a desarrollar métodos de diagnóstico basados en detección de ADN de *H. capsulatum* en muestras clínicas utilizando diferentes técnicas de PCR [Bialek *et al.*, 2002; Buitrago *et al.*, 2006 – 2007; Maubon *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2010] para ser utilizadas en el diagnóstico de histoplasmosis.

La PCR en tiempo real aquí descrita se estandarizó en un sistema TaqMan<sup>®</sup>, la secuencia blanco se eligió con base en la región ITS1 coincidiendo con un trabajo previo de Buitrago *et al.*, [2007]. Este fragmento fue elegido porque posee un alto número de copias en el genoma fúngico, lo que asegura una mayor sensibilidad. La secuencia GenBank AB055231.2 fue seleccionada específicamente para el diseño de los primers y sondas ya que ésta corresponde a una cepa del Clado LamB, clado donde se agrupan la mayoría de los aislamientos de Argentina como lo demostraron diversos autores que analizaron diversidad genética utilizando otros genes como blanco [Kasuga *et al.*, 1999; 2003]. Un análisis recientemente realizado sobre la secuencia de los ITS de aislamientos argentinos demostraron que la mayoría correspondían al Clado LamB y eran clonales para el fragmento ITS [Landaburu *et al.*, 2013]. Es relevante en el momento de elegir secuencias blanco para ser utilizadas en el diagnóstico, que estas no sean variables entre aislamientos puesto que esto afectaría la eficiencia del método.

Los primers diseñados, evaluados en el programa BLAST y probados con la reacción de



SYBR<sup>®</sup>, demostraron su eficiencia para amplificar el fragmento ITS y la sonda aportó especificidad al sistema. En nuestro estudio se determinó qué valores de Ct < 37 son positivos y se corresponden con concentraciones de ADN de *H. capsulatum*  $\geq 50$  fg/  $\mu$ l. Este límite de detección de 50 fg de ADN tuvo 100% de reproducibilidad, aunque en algunos casos donde se pudo detectar hasta 5 fg. Valores similares de sensibilidad fueron informados por [Buitrago et al., \[2007, 2013\]](#) y [Simon et al., \[2010\]](#).

La especificidad analítica, analizada frente a 29 ADN de hongos patógenos primarios diferentes a *H. capsulatum* y oportunistas, además de 18 ADN de micobacterias, fue de 98%, esto difiere de la mayoría de los autores que informan 100% de especificidad. [[Martagon-Villamil et al., 2003](#); de [Matos-Guedes et al., 2003](#); [Buitrago et al., 2006; 2007](#); [Simon et al., 2010](#)]. Se sugiere que esta caída en la especificidad es consecuencia de que, a diferencia de otros autores, se incluyó ADN de *E. crescens*, especie muy cercana filogenéticamente a *H. capsulatum*, que mostró amplificación. Esta reacción con resultado falso positivo fue descrita previamente por nuestro grupo utilizando otras técnicas de PCR [[Ibarra-Camou et al., 2011](#), [Toranzo et al., 2009](#)]. Otro antecedente, de reacción cruzada entre *H. capsulatum* y *Emmonsia* sp. está reportada en el trabajo de [Dot et al., \[2009\]](#), quienes detectaron ADN de *Emmonsia* utilizando una PCR con primers diseñados a partir del gen *18S rRNA* de *H. capsulatum*.

Durante la evaluación de la técnica de PCR en tiempo real se probaron dos controles de amplificación para detectar la presencia de inhibidores: uno interno (con primers dirigidos al gen *18S rRNA*) y otro externo (agregando ADN de *H. capsulatum*). El control interno demostró ser sensible en tejidos diferentes de sangre (89%), mientras que en sangre su sensibilidad disminuyó mas de la mitad (38%). Estos resultados nos llevaron a descartar la utilización del control interno, ya que en este trabajo, si bien se evaluaron distintos materiales clínicos, el principal material evaluado fue la sangre. Por su parte, el control

externo mostró excelentes resultados tanto con muestra de sangre como con otros tejidos.

Cuando se analizaron los materiales clínicos, y de acuerdo con el límite de detección calculado, un valor de  $Ct < 37$  se consideró compatible con presencia de ADN de *H. capsulatum* en la muestra analizada; por su parte valores de  $Ct \geq 37$ , los resultados fueron considerados dudosos y se repitió el análisis con una nueva muestra.

Nuestros resultados de sensibilidad de la PCR en el diagnóstico de histoplasmosis coinciden con los valores informados por otros autores [Buitrago *et al.*, 2006 - 2007; Simon *et al.*, 2010, Martagon-Villamil *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2010] que varían entre el 70-95% para las técnicas de PCR en tiempo real. A diferencia de otros grupos que trabajan en el tema de estandarizar un método de PCR para el diagnóstico de histoplasmosis, en este trabajo se priorizó la sangre entera como material clínico de elección por ser más accesible. La obtención de sangre no requiere de una técnica tan invasiva en la toma de muestra, como son las biopsias y los lavados bronquiales. Esto es relevante considerando que el 71% de los pacientes con histoplasmosis en este estudio eran inmunosuprimidos.

La PCR en tiempo real mostró ser significativamente menos sensible que la anidada para detectar ADN de *H. capsulatum*, tanto en muestras de sangre, como cuando se analizan sangre y además otros materiales de un mismo paciente (Tabla 5.5 y 5.6). Consideramos que la sangre es una buena opción para infecciones diseminadas en pacientes graves donde una toma de muestra a través de un método invasivo no es recomendada. Complementar los estudios utilizando ambas técnicas de PCR, aumenta la sensibilidad en 10% entre pacientes donde solo se consideró la sangre y cuando se incluyó, además, el análisis de otros materiales clínicos diferentes de sangre (Tabla 5.5 y 5.6). Sin embargo, es también importante no olvidar que la PCR anidada es mucho más susceptible a contaminaciones que la PCR en tiempo real y consecuentemente con menos potencialidad para ser utilizada en la rutina de diagnóstico.

Los VP son útiles al momento de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico. Para la PCR en tiempo real un resultado negativo descartaría la enfermedad en el 86% de casos cuando se analizan todos los materiales posibles de un mismo paciente y en un mismo episodio, en cambio solo descartaría el 76% de los casos si se analizan muestras de sangre. Esta diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) nos lleva a la misma conclusión planteada en el párrafo anterior, que cuanto mayor número y tipo de especimen clínico se analice, mayor será el valor de un resultado negativo (Tabla 5.7). Por su parte, el VPP, mostró valores superiores a 90%, independientemente del tipo y cantidad de muestras analizadas.

En este estudio el análisis de T-FFPE de pacientes con histoplasmosis mostraron sensibilidades de 90% y 70% para PCR anidada y PCR en tiempo real, respectivamente, y una especificidad de 100% (T-FFPE de pacientes con otras patologías diferentes de histoplasmosis no mostraron amplificación, datos no mostrados); coincidiendo con [Koepsell et al., 2012](#) que informaron 88.9% de sensibilidad y 100% de especificidad utilizando una PCR en tiempo real dirigida al gen *HcP100* en T-FFPE. El diagnóstico definitivo de histoplasmosis se basa en el aislamiento en cultivo del hongo, aunque El EORT/MSG Consensus Group ha sugerido que la histoplasmosis puede ser diagnosticada mediante observación del hongo en los tejidos de pacientes que habitaron y/o visitaron áreas geográficas donde la histoplasmosis es endémica [[De Pauw B et al., 2008](#)]. Las biopsias son enviadas solamente para estudios histológicos, ya sea por confusión o escasez de muestra. Una vez que el patólogo detecta levaduras en los tejidos y una reacción granulomatosa se piensa en un diagnóstico de histoplasmosis, pero esta observación puede requerir diagnóstico diferencial con *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, endosporas de *Coccidioides* sp., y parásitos intracelulares como *Leishmania* sp. [[Koepsell et al., 2012](#)]. En estos casos la PCR se convertiría en una herramienta que confirma o no la

presencia de ADN de *H. capsulatum*, ante la imposibilidad de aislamiento.

Otro material muy valioso para estudios moleculares son las improntas de materiales clínicos (MIP), ya que muchas veces éstas son mantenidas por más tiempo en los laboratorios, incluso después de eliminarse los cultivos para gérmenes comunes; las improntas, coloreadas o no, pueden ser utilizadas para detectar ADN fúngico. En nuestra experiencia, en los 18 pacientes con diagnóstico de histoplasmosis donde se analizaron MIP, en 83% (15/18) se detectó ADN de *H. capsulatum* por PCR anidada y en 78% (14/18) por PCR en tiempo real. Es interesante comentar que diez MIP fueron remitidas coloreadas con Giemsa y en 8 de éstas se pudo detectar ADN de *H. capsulatum*.

Un análisis particular requiere el grupo de pacientes cuyos resultados se caratularon como falsos positivos, en este grupo, en la mayoría de los casos se arribó a otro diagnóstico. En un caso particular (PAC 441, Tabla 5.4) no se pudo detectar causa de inmunocompromiso, el paciente mostró una imagen pulmonar compatible con micosis endémica y una pericarditis y los únicos parámetros de laboratorio que resultaron positivos fueron ambas PCR. En este caso, el paciente evolucionó satisfactoriamente sin tratamiento, y el diagnóstico quedó como desconocido. Para nuestro análisis, lo incluimos entre falsos positivos. Una explicación posible para este caso es que el paciente haya cursando una histoplasmosis pulmonar primaria que resolvió. Este hecho concuerda con lo expuesto por otros autores y el conocimiento que se tiene de la fisiopatogenia del hongo. Se sabe que los eventos que siguen a la primoinfección están asociados al estado inmune de los hospederos y en el 95% de los individuos inmunocompetentes expuestos a conidios de *H. capsulatum* resuelve la infección sin mayores consecuencias [Goodwin *et al.*, 1981; Cano & Hajjeh, 2001]. El microorganismo es depurado por el sistema inmune del hospedero y otras veces es contenido en granulomas donde el hongo puede estar muerto o en un estadio de latencia. En este punto las técnicas de PCR pueden detectar ADN fúngico, pero no pueden discernir

si el hongo es viable. Esta sería una de las principales limitantes de la detección de ADN en el diagnóstico de certeza de histoplasmosis, sobre todo cuando se analizan en T-FFPE y MIP, materiales desde los cuales el cultivo es inviable.

Otras desventajas de la PCR en tiempo real son los costos del termociclador y los reactivos, que por el momento no son accesibles a los laboratorios de diagnóstico de rutina en países en vías de desarrollo, sin embargo, esta situación está mejorando y con los avances tecnológicos los costos están disminuyendo.

En nuestro estudio no se informó la cuantificación de ADN, ni se consignaron los valores de Ct obtenidos, puesto que la sola presencia de ADN de *H. capsulatum* sumado al diagnóstico clínico presuntivo estarían indicando la presencia del hongo. Además la cuantificación de ADN de *H. capsulatum* depende de la cantidad de material clínico que es posible recolectar y enviar al laboratorio.

Algunos autores consideran a la PCR en tiempo real útil para monitorear carga fúngica después de un tratamiento específico [Buitrago *et al.*, 2007]. En nuestro estudio se pudo realizar el seguimiento de algunos pacientes con muestras de sangre con un volumen estandarizado (3 ml) y en algunos de estos casos pudo detectarse la reactivación de la patología y en otros se observó la negativización al concluir el tratamiento. Sin embargo, no hay que olvidar que la presencia de ADN no indica viabilidad del hongo y la ausencia de ADN fúngico podría relacionarse a lo transitorio de las funguemias; por ello trabajar con muestras seriadas sería lo más acertado tanto para el diagnóstico como para el seguimiento.

El resultado negativo obtenido en 150 muestras de sangre de individuos sanos, nos confirmaría que la población que vive en el área endémica de histoplasmosis, donde se calcula que alrededor del 35% de la población tuvo una primoinfección, no tienen ADN de *H. capsulatum* circulando en sangre.

## 7. CONCLUSIONES

- La PCR en tiempo real diseñada demostró ser sensible para detectar ADN de *H. capsulatum*, pudiendo detectar hasta 50 fg de ADN en todas las repeticiones.
- Los primers y sondas diseñados mostraron 98% de especificidad cuando se evaluaron frente a ADN de microorganismos diferentes de *H. capsulatum*.
- El control externo (ADN fúngico en tubo independiente) fue eficiente en sangre y otros tejidos. El control interno (gen *18S rRNA*) no fue eficiente en muestras de sangre.
- Para asegurar la validez de la reacción es importante incluir controles en la ejecución (control negativo, positivo y control de inhibición).
- En la PCR en tiempo real valores  $Ct < 37$  correspondería a presencia de ADN de *H. capsulatum* en los materiales analizados.
- Los valores de  $Ct \geq 37$  deben ser considerados dudosos y se deben solicitar nuevas muestras para el estudio. En estos casos se puede considerar el resultado de la PCR anidada que resulta más sensible para el diagnóstico.
- La PCR en tiempo real evaluada demostró ser sensible y específica y permitió detectar ADN de *H. capsulatum* en muestras de sangre y otros materiales clínicos, inclusive muestras formoladas e incluidas en parafina y frotis de materiales, incluso coloreados.
- El análisis de los resultados de ambas PCR sobre muestras clínicas analizadas nos permitió concluir que la PCR en tiempo real es menos sensible que la PCR anidada ( $P < 0.05$ ) para el diagnóstico de la histoplasmosis. Sin embargo, es importante señalar las ventajas de la primera, que es la menor manipulación de la muestra y la disminución en el tiempo de diagnóstico. Esto la convierte en una técnica con

potencialidad para ser transferida a laboratorios de diagnóstico.

- La alta especificidad de ambas técnicas de PCR fue independiente de si se utiliza sangre o sangre y otros especímenes clínicos para el diagnóstico.
- Se propone la sangre como una primera opción en el diagnóstico de histoplasmosis (por su accesibilidad) e incluir otros materiales en el caso que sea posible y/o necesario ya que aumentaría significativamente la sensibilidad y el VPN de ambas PCR.
- Los VPP de ambas PCR fueron superiores a 90% para el diagnóstico de histoplasmosis independientemente si se utiliza sangre entera como única muestra para el diagnóstico o cuando se incluyen otros materiales.
- Estas técnicas complementan las técnicas microbiológicas clásicas (microscopía, cultivo y serología) y de ninguna manera las reemplazan. Son muy útiles, especialmente en pacientes inmunosuprimidos donde la posibilidad de detectar anticuerpo es casi nula y acceder a una muestra clínica invasiva a veces es difícil.

## 8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstiuk C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S. Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1): 163-165.
2. Arenas R. Histoplasmosis. En: *Micología Médica Ilustrada*. 3<sup>a</sup> ed. Arenas R editor. México: Editorial Interamericana McGraw-Hill; 2008.P p.190-199.
3. Ashbee HR, Evans EG, Viviani MA, Dupont B, Chryssanthou E, Surmont I, Tomsikova A, Vachkov P, Enero B, Zala J, Tintelnot K; ECMM Working Group on; Histoplasmosis. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med Mycol.* 2008; 46(1): 57-65.
4. Bava AJ. Histoplasmosis in the Muñiz Hospital of Buenos Aires *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995; 37: 531-535.
5. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1644-1647.
6. Bianchi M, Robles AM, Vitale R, Helou S, Arechavala A, Negroni R. The usefulness of blood culture in diagnosing HIV-related systemic mycoses: evaluation of a manual lysis centrifugation method. *Med Mycol.* 2000; 38(1): 77-80.
7. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 1753-1755



8. Brandt ME, Gaunt D, Iqbal N, McClinton S, Hambleton S, Sigler L. False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe chemiluminescent test result caused by a *Chrysosporium* species. J Clin Microbiol. 2005. 43: 1456-1458.
9. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 25: 665-668.
10. 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. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. Rev Iberoam Micol. 2013; 30(4): 256-260.
11. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25: 16-22.
12. Burek-Huntington KA, Gill V, Bradway DS. Locally Acquired Disseminated Histoplasmosis in a Northern Sea Otter (*Enhydra lutris kenyoni*) in Alaska, USA. J Wildl Dis. 2014; 50: 389-392.
13. Calanni LM, Pérez RA, Brasili S, Schmidt NG, Iovannitti CA, Zuiani MF, Negroni R, Finquelievich J, Canteros CE. Outbreak of histoplasmosis in province of Neuquén, Patagonia Argentina. Rev Iberoam Micol. 2013; 30(3): 193-199.
14. Cano VC, Hajjeh RA The epidemiology of histoplasmosis: a review. Semin Respir Infect. 2001; 16: 109-118.

15. Canteros CE, Toranzo A, Suárez-Alvarez R, Davel G, Castañon-Olivares LR, Nápoli J. Genetic characterization of the fungus involved in the first case of coccidioidomycosis described by Alejandro Posadas in 1892. *Medicina (Buenos Aires)*. 2009; 69(2): 215-220.
16. Canteros CE, Rivas MC, Soria M, Lee W, Perrotta D, Rodero L, Davel G, Grupo EMMB. Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: estudio multicéntrico en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2004; 36: 68-74.
17. Centers for Disease Control and Prevention. Section VIII - Agent Summary Statements B: Fungal Agents in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition (December 2009) pp 170-181 Disponible en <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/> Consultado: 30/08/2014
18. Chakrabarti A, Slavin MA. Endemic fungal infections in the Asia-Pacific región. *Med Mycol*. 2011; 49: 337-344.
19. Chamany S, Mirza SA, Fleming JW, Howell JF, Lenhart SW, Mortimer VD, Phelan MA, Lindsley MD, Iqbal NJ, Wheat LJ, Brandt ME, Warnock DW, Hajjeh RA. A large histoplasmosis outbreak among high school students in Indiana. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23: 909-914.
20. Davel G, Canteros CE. Epidemiological status of mycoses in the Argentine Republic. *Rev Argent Microbiol*. 2007; 39(1): 28-33.

21. Davel G, Mazza M, Refojo N, Rivas C, Canteros C. Grupo Encuesta 2008. Prevalencia de las Micosis humanas en Argentina. XII Congreso Argentino de Microbiología I VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología (SADEBAC) y el I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (DiMAyA), 17-20 de octubre de 2010. Buenos Aires. Argentina.
22. de Matos Guedes HL, Guimaraes AJ, de Medeiros Muniz M, Pizzini CL, Hamilton AJ, Peralta JM, *et al.*, PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* vbased on the nucleotide sequence of the M antigen. J Clin Microbiol. 2003; 41:535-539.
23. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008;46(12): 1813-1821.
24. Dot JM, Debourgogne A, Champigneulle J, Salles Y, Brizion M, Puyhardy JM, Collomb J, Plénat F, Machouart M. Molecular diagnosis of disseminated adiaspiromycosis due to *Emmonsia crescens*. J Clin Microbiol. 2009; 47(4): 1269-73.

25. Espinosa-Avilés D, Taylor ML, del Rocio Reyes-Montes M, Pérez-Torrez A. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). J Zoo Wild Med. 2008; 39(3): 450-454.
26. Frías De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes M del R. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. J Clin Microbiol. 2012; 50(3): 673-679.
27. Frías De León MG, Taylor ML, Hernández-Ramírez A, Reyes-Montes MR. Utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la histoplasmosis. Rev Mex Micol. 2007; 25: 83-90.
28. García-Vázquez E, Velasco M, Gascón J, Corachán M, Mejías T, Torres-Rodríguez JM. Infección por *Histoplasma capsulatum* en un grupo de cooperantes en Guatemala. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005; 23: 274-276.
29. Gildea LA, Ciralo GM, Morris RE, Newman SL. Human dendritic cell activity against *Histoplasma capsulatum* is mediated via phagolysosomal fusion. Infect Immun. 2005;73(10): 6803-6811.
30. Goodwin JE, Lloyd R, Des Prez R. Histoplasmosis in normal host. Medicine. 1981; 60: 231-266.
31. Graybill JR. Histoplasmosis and AIDS. J Infect Dis. 1998; 158: 623-626.
32. Gugnani HC. Histoplasmosis in Africa: a review. Indian J Chest Dis Allied Sci. 2000; 42(4): 271-277.
33. Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of Histoplasmosis. Braz J Microbiol. 2006; 37(1): 1-13.

34. Gutierrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat J. Detection of *Histoplasma capsulatum* Antigen in Panamanian Patients with Disseminated Histoplasmosis and AIDS Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(4): 681–683.
35. Hage CA, Wheat LJ. Diagnosis of pulmonary histoplasmosis using antigen detection in the bronchoalveolar lavage. Expert Rev Respir Med. 2010; 4(4): 427-429.
36. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. J Clin Microbiol. 1992; 30 (11): 3003-3004.
37. Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. J Clin Microbiol. 1993; 31(2): 419-421.
38. Huhn GD, Austin C, Carr M, Heyer D, Boudreau P, Gilbert G, Eimen T, Lindsley MD, Cali S, Conover CS, Dworkin MS. Two outbreaks of occupationally acquired histoplasmosis: more than workers at risk. Health Perspect. 2005; 113: 585-589.
39. Ibarra-Camou B, Toranzo AI, Lee W, Davel G, Canteros CE. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* in culture lysates. Rev Iberoam Micol. 2011; 28(1): 26-31.
40. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. J Clin Microbiol. 1999; 37: 653-663.
41. 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, Zhenyu Q, Negróni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Taylor JW. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mol Ecol. 2003; 12: 3383-3401.

42. Kauffman CA. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21(4): 421-425.
43. Koepsell SA, Hinrichs SH, Iwen PC. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(10): 3395-3397.
44. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. En *Medical Mycology*. Kwon-Chung K.J., Bennett J.E., editors. Philadelphia-London: Lea & Febiger; 1992. Pp. 464-513.
45. Landaburu F, Cuestas ML, Rubio A, Elías NA, Daneri GL, Veciño C, Iovannitti CA, Mujica MT. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from Argentina based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed spacer regions of rDNA. *Mycoses.* 2014 May;57(5): 299-306.
46. Lacaz CD, Del Negro GM, Vidal MS, Heins-Vaccari EM, Santos RF, Martins MA, Ozaki MM, Romiti R, Proenca R, Castro LG. Atypical disseminated cutaneous histoplasmosis in an immunocompetent child, caused by an "aberrant" variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999; 41: 195-202.
47. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microb.* 2003; 41: 1295-1298.
48. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58: 441-444.

49. McKinsey DS, Spiegel RA, Hutwagner L, Stanford J, Driks MR, Brewer J, Gupta MR, Smith DL, O'Connor MC, Dall L. Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: Incidence, risk factors, and pathophysiology. *Clin Infect Dis.* 1997; 24: 1195-1203.
50. McLeod DS, Mortimer RH, Perry-Keene DA, Allworth A, Woods ML, Perry-Keene J, McBride WJ, Coulter C, Robson JM. Histoplasmosis in Australia: report of 16 cases and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2011; 90(1): 61-68.
51. Morris PR, Terreni AA, DiSalvo AF. Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*-an unusual variant. *J Med Vet Mycol.* 1986; 24: 231-233.
52. Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, Muskus C, Cano LE, González A. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 62-67.
53. Negroni R, Robles AM, Arechavala A, Taborda A. Histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA. Su evolución y tratamiento. *Rev Argent Micol.* 1991; 14: 5-12.
54. Negroni R, Robles AM, Arechavala A. Histoplasmosis progresiva. Estudio en un lapso de 10 años. *Rev Argent Micol.* 1994; 17: 14-21.
55. Negroni R, Taborda A, Benetucci J, Da Bouza J, Macias J. Manifestaciones cutaneomucosas de la histoplasmosis en pacientes con SIDA. *Rev Arg Derm.* 1990; 71: 71-78.

56. Negroni R, Duré R, Ortiz Nareto Á., Arechavala AI., Maiolo EI., Santiso GM, Iovannitti C, Ibarra-Camou B., Canteros CE. Brote de histoplasmosis en la Escuela de Cadetes de la Base Aérea de Morón, Provincia de Buenos Aires, República Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2010; 42: 254-260.
57. Newman SL. Interaction of *Histoplasma capsulatum* with human macrophages, dendritic cells, and neutrophils. *Methods Mol Med.* 2005; 118: 181-191.
58. Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother.* 2013; 19(5): 999-1003.
59. Oliveira Fde M, Fernandes SS, Severo CB, Guazzelli LS, Severo LC. *Histoplasma capsulatum* fungemia in patients with acquired immunodeficiency syndrome: detection by lysis-centrifugation blood-culturing technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007; 49(3): 135-138.
60. Pan B, Chen M, Pan W, Liao W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. *Mycoses.* 2013; 56(3): 212-221.
61. Pietrobon D, Negro-Marquínez, Kilstein J, Galindez J, Greca A, Battagliotti C. Histoplasmosis diseminada y SIDA en un hospital argentino: manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22: 156-159.
62. Pizzini CV, Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(1): 20-3.



63. Porta A, Maresca B. Host response and *Histoplasma capsulatum*/macrophage molecular interactions. *Med Mycol.* 2000; 38: 309-406.
64. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 2977-2982.
65. Retallack DM, Woods JP Molecular epidemiology, pathogenesis, and genetics of the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Microbes Infect.* 1999; 1: 817-825.
66. Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Parás-García A, Juan-Sallés C, Taylor ML. 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.* 2009; 41(2): 102-104.
67. Rubinstein P, Negroni R. Histoplasmosis: en Micosis broncopulmonares del adulto y del niño 2da. Rubinstein P, Negroni R editors. Buenos Aires: Editorial Beta SRL; 1981. Pp. 249-290.
68. Sandin RL, Isada CM, Hall GS, Tomford JW, Rutherford I, Rogers AL, Washington JA. Aberrant *Histoplasma capsulatum*. Confirmation of identity by a chemiluminescence-labeled DNA probe. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993; 17: 235-238.
69. Schlech WF 3rd, Wheat LJ, Ho JL, French ML, Weeks RJ, Kohler RB, Deane CE, Eitzen HE, Band JD. Recurrent urban histoplasmosis, Indianapolis, Indiana, 1980-1981. *Am J Epidemiol.* 1983; 118: 301-312.

70. 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: 268-273.
71. Standard PG, Kaufman L. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J Clin Microbiol.* 1976; 3: 191-199.
72. Stobierski MG, Hospedales CJ, Hall WN, Robinson-Dunn B, Hoch D, Sheill DA. Outbreak of histoplasmosis among employees in a paper factory-Michigan, 1993. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1220-1223.
73. Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts G. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminiscent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 845-850.
74. Suárez-Alvarez RO, Pérez-Torres A, Taylor ML. Interacción de conidios y fragmentos hifales de *Histoplasma capsulatum* con el NALT de ratones. X Congreso Argentino de Micología, XX Jornadas Argentinas de Micología, Resumen 97, 2005; Buenos Aires, Argentina.
75. Swartzentruber S, Rhodes L, Kurkjian K, Zahn M, Brandt ME, Connoly P, Wheat LJ. Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection. *Clin Infect Dis.* 2009; 49, 1878–1882.

76. Taylor ML, Ruíz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Alvarez O, Roldán-Aragón Y, Romero-Martínez R, Sahaza-Carmona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval G. Identification of the infection source of an unusual outbreak of histoplasmosis in a hotel in Acapulco state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 1;45: 435-441.
77. Toranzo AI, Tiraboschi IN, Fernandez N, Ibarra-Camou B., Rivas MC, Lee W, Davel G, Canteros CE. [Molecular diagnosis of human histoplasmosis in whole blood samples]. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41:20-26.
78. Velasco-Castrejón O La histoplasmosis pulmonar primaria en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 1998; 11: 221-225.
79. Waldman RJ, England AC, Tauxe R, Kline T, Weeks RJ, Ajello L, Kaufman L, Wentworth B, Fraser DW. A winter outbreak of acute histoplasmosis in northern Michigan. *Am J Epidemiol.* 1983; 117: 68-75.
80. Wheat L. Histoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Curr Trop Med Mycol.* 1996; 7: 7-18.
81. Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol.* 2002; 35: 81-97.
82. Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. Aislamientos de *Histoplasma capsulatum* con morfología aberrante obtenidos en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38: 79-83.