



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Facultad de Medicina**

“Evaluación y comparación de dos  
marcadores SCARs para la detección  
de *Histoplasma capsulatum*”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**BIOLÓGICAS**

**(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARÍA GUADALUPE FRÍAS DE LEÓN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

### **Al Posgrado en Ciencias Biológicas**

**A DGAPA** por el financiamiento del proyecto “Obtención de marcadores SCARs de *Histoplasma capsulatum* a partir de RAPD-PCR”

**(IN219703-2)**

**A CONACYT** por la beca **(199428)** concedida a la autora durante el tiempo reglamentario de la maestría

#### **Comité tutorial:**

**Dra.: María del Rocío Reyes Montes**

**Dra.: Maria Lucia Taylor**

**Dra.: María del Carmen Calderón Ezquerro**

## A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco infinitamente a la **Dra. María del Rocío Reyes Montes** por todo el apoyo académico, económico y moral que amablemente me brindó para llevar a cabo la maestría y especialmente por su paciencia y amistad.

Sincero agradecimiento a la **Dra. Maria Lucia Taylor**, por todo el material biológico que me proporcionó para la realización de este trabajo y por todas sus excelentes aportaciones y correcciones al mismo.

A la **Dra. Maria del Carmen Calderón Ezquerro**, por todos los consejos académicos y personales.

Al **Dr. Jorge O. García Méndez** por proporcionarme gran parte de las muestras clínicas analizadas en este trabajo.

A la **Dra. Margarita Villegas Ríos** y al **Dr. Joaquín Cifuentes Blanco** por el tiempo tan valioso que dedicaron a la revisión del trabajo y por sus importantes observaciones.

A la **Biol. Erika Arroyo Vázquez** por su apoyo en TODO, pero principalmente por su amistad.

A los integrantes de los Laboratorios de **Micología Molecular (QFB. Aurora Hernández Ramírez, M en C. Esperanza Duarte Escalante)** y **Micología Básica (Dra. Concepción Toriello Nájera, M en C. Hortensia Navarro Barranco)** de la **Facultad de Medicina**, por facilitarme las cosas durante la realización de la maestría.

**A nuestro gran amigo**

## ÍNDICE

	PÁG.
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>9</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>9</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
Aislados y DNAs fúngicos	<b>11</b>
Muestras de tejidos	<b>13</b>
Muestras de suelo	<b>13</b>
Extracción de DNA	<b>17</b>
DNA de aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i>	<b>17</b>
DNA de tejidos	<b>17</b>
DNA de muestras de suelo	<b>18</b>
Determinación de la concentración de DNA	<b>19</b>
<b>Condiciones óptimas para la PCR</b>	<b>19</b>
Para los marcadores SCARs	<b>19</b>
Para la sonda del antígeno M	<b>19</b>
<b>Análisis de la homología entre las secuencias de los marcadores SCARs</b>	<b>20</b>

	<b>PÁG.</b>
<b>Especificidad de los marcadores SCARs por Southern blot</b>	<b>20</b>
Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa	20
Southern blot	21
Marcaje de las sondas SCARs	21
Dot blot e hibridación	22
Hibridación	22
Preparación de la membrana de nylon	22
Prehibridación e hibridación de las sondas	22
Incubación con el conjugado anti-digoxigenin-AP	23
Visualización de las bandas por método colorimétrico	23
<b>Análisis de la especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M</b>	<b>23</b>
Aislados homólogos y heterólogos	23
Muestras clínicas	23
Muestras de ambientes naturales	24
<b>Cuantificación de UFC de <i>H. capsulatum</i> en muestras de suelo detectadas por PCR</b>	<b>24</b>
<b>Análisis de la sensibilidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
DNA de aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i>	25
DNA de tejidos	25
DNA de muestras de suelo	26
Determinación de la concentración de DNA	27
<b>Análisis de la homología entre la secuencias de los marcadores SCARs</b>	<b>28</b>
<b>Especificidad de los marcadores SCARs por Southern blot</b>	<b>28</b>
Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa	28
Southern blot	29
Marcaje de las sondas SCARs	29
Dot blot	29
Hibridación con las sondas 1253 <sub>220(Hc)</sub> y 1253 <sub>230(Hc)</sub>	30

	<b>PÁG.</b>
<b>Análisis de la especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M</b>	<b>31</b>
Aislados homólogos	31
Aislados heterólogos	35
Muestras clínicas	38
Muestras de ambientes naturales	42
<b>Cuantificación del número de UFC en muestras de suelo</b>	<b>48</b>
<b>Análisis de la sensibilidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Extracción de DNA de aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i> procedentes de MX, EUA y PA	<b>25</b>
<b>Figura 2.</b> Extracción de DNA de tejido de ratón con el DNeasy Tissue kit	<b>26</b>
<b>Figura 3.</b> Detección de DNA extraído de tejidos de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Obtención de DNA de muestras de suelo	<b>27</b>
<b>Figura 5.</b> Determinación de las concentraciones de DNA de aislados de <i>H. capsulatum</i>	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> RAPD-PCR de aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i> , de diferentes orígenes geográficos	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Obtención, purificación y cuantificación de las sondas SCARs	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b> Curva de eficiencia de marcaje de los SCARs con digoxigenina	<b>30</b>
<b>Figura 9.</b> Hibridación de los patrones polimórficos por RAPD-PCR de aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i> con las sondas SCARs	<b>31</b>



	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 10.</b> PCR con el marcador SCAR 1253 <sub>220(Hc)</sub>	32
<b>Figura 11.</b> PCR con el marcador SCAR 1253 <sub>230(Hc)</sub>	32
<b>Figura 12.</b> PCR con la sonda del antígeno M	33
<b>Figura 13.</b> Curva de temperatura de alineamiento para la sonda del antígeno M	33
<b>Figura 14.</b> Curva de concentraciones de DNA para la sonda del antígeno M	34
<b>Figura 15.</b> PCR con las condiciones óptimas para la sonda del antígeno M	35
<b>Figura 16.</b> Especificidad del marcador SCAR 1253 <sub>220(Hc)</sub>	36
<b>Figura 17.</b> Especificidad del marcador SCAR 1253 <sub>230(Hc)</sub>	37
<b>Figura 18.</b> Especificidad de la sonda del antígeno M	38
<b>Figura 19.</b> PCR de muestras de tejido de un paciente con cuadro clínico compatible con la histoplasmosis	39
<b>Figura 20.</b> PCR de muestras de tejidos obtenidas de pacientes con cuadro clínico compatible con la histoplasmosis	40
<b>Figura 21.</b> Especificidad de los marcadores SCARs y la sonda del antígeno M utilizando muestras clínicas	41
<b>Figura 22.</b> Especificidad de los marcadores SCARs y la sonda del antígeno M utilizando muestras de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis	42
<b>Figura 23.</b> Curva de concentración de DNA de una muestra de tejido de ratón	43
<b>Figura 24.</b> PCR de muestras de tejido de murciélagos y ratones experimentalmente infectados con <i>H. capsulatum</i>	43
<b>Figura 25.</b> PCR de muestras de tejido de animales mantenidos en cautiverio e infectados naturalmente con <i>H. capsulatum</i>	44
<b>Figura 26.</b> PCR de muestras de tejido de ualabi mantenido en cautiverio e infectado naturalmente con <i>H. capsulatum</i>	45
<b>Figura 27.</b> PCR de DNA extraído de suelo contaminado con <i>H. capsulatum</i>	45
<b>Figura 28.</b> PCR de DNA extraído de suelo contaminado con <i>H. capsulatum</i> , utilizando BSA	46
<b>Figura 29.</b> Especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M en muestras de guano de murciélagos	47
<b>Figura 30.</b> Especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M en muestras de guano colectadas en zonas endémicas de MX	47
<b>Figura 31.</b> Correlación entre la PCR de los DNAs obtenidos de las diluciones de	

	<b>PÁG.</b>
micelio y el número de UFC de <i>H. capsulatum</i> en muestras de suelo	49
<b>Figura 32.</b> Determinación de la sensibilidad de los marcadores SCARs	50
<b>Figura 33.</b> Determinación de la sensibilidad de la sonda del antígeno M	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aislados y cepas de <i>H. capsulatum</i>	12
<b>Tabla 2.</b> Otros DNAs fúngicos utilizados	13
<b>Tabla 3.</b> Muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis	14
<b>Tabla 4.</b> Tejidos de animales experimentalmente infectados con <i>H. capsulatum</i>	14
<b>Tabla 5.</b> Tejidos de animales naturalmente infectados con <i>H. capsulatum</i>	15
<b>Tabla 6.</b> Muestras de suelo contaminadas experimentalmente con micelio de <i>H. capsulatum</i>	16
<b>Tabla 7.</b> Muestras de guano de murciélagos mantenidos en cautiverio e infectados experimentalmente con <i>H. capsulatum</i>	16
<b>Tabla 8.</b> Muestras de guano colectadas en diferentes zonas endémicas del país	16
<b>Tabla 9.</b> Curva de concentración de micelio de <i>H. capsulatum</i> determinada por densidad óptica	48
<b>Tabla 10.</b> Relación entre las diluciones de micelio de <i>H. capsulatum</i> y las UFC	50

## RESUMEN

*Histoplasma capsulatum*, agente causal de la histoplasmosis, es un hongo dimórfico de distribución mundial. La presencia del hongo se ha demostrado en sitios de alto y bajo riesgo de infección en toda la República Mexicana, tanto en zonas rurales como urbanas, lo que representa un posible problema de salud ambiental. Con fines epidemiológico y diagnóstico, desarrollamos dos marcadores SCARs (Región Amplificada de una Secuencia Caracterizada), 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, a partir de una banda repetitiva revelada por RAPD-PCR (Amplificación al Azar del DNA Polimórfico por la Reacción en Cadena de la Polimerasa) de diversos aislados de *H. capsulatum*. Para proponer estos marcadores como nueva herramienta en la identificación del patógeno, en este trabajo evaluamos los parámetros de especificidad por PCR y Southern blot; así como la sensibilidad para la detección del hongo en muestras de tejido (pacientes y mamíferos infectados) y de guano, y se compararon los resultados obtenidos con la sonda del antígeno M, reportada en la literatura. Los tres marcadores amplificaron todos los aislados de *H. capsulatum* procedentes de diferentes países en América. Por Southern blot, los SCARs mostraron especificidad al hongo, además se encontró que las secuencias de estos marcadores son de una sola copia dentro del genoma del hongo, porque se observó sólo una señal de hibridación. La sensibilidad de los marcadores SCARs fue de 1 pg de DNA, mientras que la sonda del antígeno M no detectó menos de 500 pg de DNA de *H. capsulatum*. La sonda 1253<sub>220(Hc)</sub> fue específica y detectó al patógeno tanto en muestras clínicas como en muestras de la naturaleza; el SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> identificó al hongo en las muestras analizadas pero mostró homología con *A. niger*. La sonda del antígeno M también detectó al patógeno en algunas muestras clínicas; sin embargo, resultó inespecífica porque amplificó también el DNA de *C. neoformans* y de humano, por lo que el uso de estas dos sondas en diagnóstico es poco confiable debido a su inespecificidad.

En suelo, los SCARs detectaron hasta 20 UFC/g de suelo y la sonda del antígeno M detectó únicamente 640 UFC/g de suelo. En las muestras de guano colectado en zonas endémicas de México, los SCARs identificaron a *H. capsulatum* en cuatro muestras mientras que la sonda del antígeno M sólo lo detectó en dos; la escasa sensibilidad de esta sonda limita su uso en estudios epidemiológicos. Los resultados obtenidos nos indican que el SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> es una buena herramienta para el diagnóstico de la histoplasmosis y para la identificación de zonas de alto riesgo para la adquisición de la histoplasmosis en nuestro país.

## ABSTRACT

*Histoplasma capsulatum*, the histoplasmosis causing agent, is a dimorphic fungus distributed worldwide. This fungus has been shown to be present in low and high risk sites of possible infection throughout the Mexican Republic, both in rural and urban areas, thereby representing a possible risk for environmental health. For epidemiological and diagnostic purposes, we developed two SCAR markers (Sequence Characterized Amplified Region), 1253<sub>220(Hc)</sub> and 1253<sub>230(Hc)</sub>, from a repeated band revealed by RAPD-PCR (the Randomized Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) from several *H. capsulatum* isolates, to propose these markers as new tools for pathogen identification. In this study, several specificity PCR and Southern blot parameters were assessed, as well as the sensitivity for the detection of the fungus in tissue samples (infected patients and mammals) and feces (guano), comparing the results obtained with the antigen M probe reported in the literature.

The three markers amplified all of the *H. capsulatum* isolates from different countries of the Americas. Using Southern blot, the SCARs showed specificity for the fungus. In addition, it was found that these marker sequences are single copies within the fungus genome since only one hybridization sign was registered. The sensitivity of the SCAR markers was 1 pg DNA, while the antigen M probe did not detect less than 500 pg of *H. capsulatum* DNA. The 1253<sub>220(Hc)</sub> probe was pathogen-specific and achieved detection in both clinical samples, as well as samples from nature. SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> identified the fungus in the samples analyzed but was homologous for *A. niger*. The antigen M probe also detected the pathogen in some clinical samples; however, it resulted unspecific for *H. capsulatum* because it also amplified *C. neoformans* and human DNA. The use of these latter diagnostic probes is unreliable due to their lack of specificity. In soil, the SCARs detected up to 20 CFU/g soil and the antigen M probe only detected 640 CFU/g soil. In the collected guano samples from endemic zones of Mexico, SCARs identified *H. capsulatum* in four samples while the antigen M probe detected it in two. The poor sensitivity of this probe limits its use in epidemiological studies.

Results indicate that 1253<sub>220(Hc)</sub> is a good tool for the diagnosis of histoplasmosis and for the identification of high risk zones to get histoplasmosis in our country.

## INTRODUCCIÓN

*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* es un hongo patógeno del humano y otros mamíferos que tiene la característica especial de ser dimórfico, es decir, presenta una fase micelial geofílica (forma infectiva) y una fase levaduriforme (forma parasitaria). La morfología microscópica de la fase micelial se define por la presencia de abundantes hifas septadas, delgadas e hialinas, con microconidios de 2 a 4  $\mu\text{m}$  y macroconidios de 8 a 16  $\mu\text{m}$  de diámetro insertados en conidióforos cortos que forman un ángulo de 90° con la hifa principal. Los macroconidios típicos son de pared celular gruesa, espiculados y forman proyecciones digitiformes (Tewari *et al.*, 1998). La fase parasitaria del hongo está constituida por levaduras que, de preferencia, se desarrollan intracelularmente en huéspedes parasitados o en cultivos enriquecidos con cisteína y glucosa, a 37°C. Las levaduras son redondas u ovals, miden de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, uninucleadas, se reproducen por gemación formando, en general, blastosporas de base estrecha.

*H. capsulatum* es de distribución mundial, pero la histoplasmosis presenta regiones de endemicidad en Estados Unidos (EUA) y América Latina. En México (MX), la presencia del hongo se ha demostrado en todo el país, predominando en los estados de Campeche, Tabasco, Chiapas, Guerrero, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz y Oaxaca (Vaca-Marín *et al.*, 1998). Antiguamente se pensaba que el hábitat de *H. capsulatum* estaba restringido a lugares cerrados (minas, cuevas, grutas, túneles, construcciones abandonadas, etc.) en donde la acumulación de guano de murciélagos aunada a las condiciones de temperatura (22 a 30°C), humedad relativa mayor del 60% y oscuridad propiciaban el desarrollo y la óptima esporulación del hongo. Sin embargo, hallazgos recientes demuestran que el patógeno también se encuentra en lugares abiertos, tanto en zonas rurales como urbanas, en donde se acumula gran cantidad de guano de aves (granjas avícolas, patios con aves de corral y debajo de las copas de árboles). En zonas urbanas de México, destaca el aislamiento del patógeno en el parque de Tlalpan, en el Distrito Federal, y en una unidad habitacional del FOVISSSTE en Sinaloa (Taylor *et al.*, 2006); así como dos aislamientos del hongo en un hotel del Puerto de Acapulco, Guerrero (Taylor *et al.*, 2005b); en donde, durante el 2001, se registraron varios episodios de un brote epidémico de histoplasmosis (Morgan *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2005b). La fuente de infección de los brotes fue determinada por Taylor *et al.* (2005b), quienes con base en criterios morfológicos,

histopatológicos, antigénicos y moleculares identificaron dos aislados de *H. capsulatum* obtenidos a partir de ratones inoculados con diferentes muestras de tierra de jardineras localizadas dentro del hotel, las cuales fueron fertilizadas con material de composta mezclado con guano de murciélago. En otros países, también se han registrado brotes urbanos de histoplasmosis, el más destacado ocurrió en Indianápolis, EUA; pero el origen no fue determinado (Schlech *et al.*, 1983; Wheat *et al.*, 1981). Estos acontecimientos demuestran la gran ubicuidad del hongo y apoyan la opinión de quienes proponen que la histoplasmosis representa un problema de salud ambiental y ocupacional para las personas que frecuentan, con fines laborales o recreativos, las zonas consideradas de alto riesgo de infección (lugares con abundantes excretas de murciélagos y aves) (Pedroza-Serés *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994; 1996; 1997a; 2000b; 2000c; Vaca-Marín *et al.*, 1998; Velasco-Castrejón, 1998).

Dependiendo del grado de exposición a los propágulos infectivos del hongo, la histoplasmosis puede manifestarse desde formas clínicas muy leves, que algunas veces son confundidas con catarro común, hasta formas con síntomas severos. En MX, la forma clínica predominante es la pulmonar primaria y se diagnostica principalmente en adultos, ocasionalmente se asocia a cavitaciones pulmonares que simulan un cuadro clínico indistinguible de la tuberculosis pulmonar, por lo que en nuestro país la histoplasmosis generalmente esta subnotificada (Vaca-Marín *et al.*, 1998; Velasco-Castrejón, 1998). Las personas con deficiencias inmunológicas, principalmente las que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), son las más vulnerables a la histoplasmosis y otras infecciones fúngicas, presentando con frecuencia un pronóstico grave con curso clínico hacia la forma diseminada (Tewari *et al.*, 1998).

El diagnóstico definitivo de la histoplasmosis se logra con el aislamiento del agente causal a partir de muestras clínicas, pero esto resulta difícil dependiendo de la forma clínica. Por lo que el diagnóstico se apoya en una serie de pruebas de laboratorio, tales como: análisis histopatológico, pruebas serológicas para la detección de anticuerpos y rastreo de antígenos en líquidos corporales, pero cada uno de estos ensayos también presenta diferentes restricciones. El análisis histopatológico es una buena opción diagnóstica, pero su interpretación depende de un muestreo adecuado, de la experiencia del observador y de la coloración histoquímica empleada. Resultados falsos positivos pueden atribuirse a la presencia de otros organismos con características morfológicas similares a *H. capsulatum* como: *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffei*, *Pneumocystis carinii*,

*Toxoplasma gondii* y *Leishmania* spp. (Lamps *et al.*, 2000; Tewari *et al.*, 1998; Wheat, 2003). Los procedimientos de inmunodiagnóstico (Gómez *et al.*, 1997; Wheat, 1994; Wheat, 2003; Williams *et al.*, 1994), son de mayor utilidad pero pueden presentar reacciones cruzadas con otras especies de hongos asociados a cuadros clínicos semejantes, principalmente si el paciente procede de áreas endémicas compartidas.

Estas restricciones han impulsado el desarrollo de métodos más sensibles que permitan demostrar la presencia de pequeñas cantidades del material genético del agente etiológico en las muestras del paciente para aplicarlos como pruebas confirmatorias (Chemaly *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 1992; Tewari *et al.*, 1998).

Actualmente, la prueba confirmatoria que se usa con mayor frecuencia es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con una sonda específica de ácido desoxirribonucleico (DNA). Para la identificación de *H. capsulatum*, se han diseñado diversas sondas, como las descritas por Keath *et al.* (1989) y Spitzer *et al.* (1989) quienes al tipificar aislados del hongo provenientes de diferentes fuentes y orígenes geográficos, mediante el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) e hibridación con sondas de DNA mitocondrial (mtDNA) y del gen *yps3*, lograron clasificar al hongo en seis clases (Keath *et al.*, 1992). Estas sondas resultaron específicas de *H. capsulatum* ya que no hibridaron con DNAs de *B. dermatitidis*, *Candida* sp., *Sepedonium chrysospermum*, *Chrysosporium keratinophilum* y *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que fueron propuestas como herramientas importantes para la identificación del hongo (Keath *et al.*, 1992). A nivel comercial, las primeras sondas de DNA (Accuprobe) disponibles para la identificación de hongos patógenos del hombre fueron producidas por la casa comercial Gen-Probe Inc. (San Diego, CA). Estas sondas quimioluminiscentes son complementarias a una secuencia de ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) y su utilidad ha sido ampliamente evaluada. Huffnagle y Gander (1993) analizaron la capacidad de dos Accuprobe para la identificación de *H. capsulatum* y *C. neoformans* a partir de especímenes clínicos, encontrando una sensibilidad y una especificidad del 100% para ambas sondas. Stockman *et al.* (1993) evaluaron cuatro Accuprobe especie-específicas de *H. capsulatum*, *C. neoformans*, *Coccidioides immitis* y *B. dermatitidis*. La sensibilidad y la especificidad de las sondas resultaron del 100%.

Sandhu *et al.* (1995) desarrollaron una estrategia diagnóstica con base en la utilización de oligonucleótidos altamente específicos. Para ello, secuenciaron una parte de la región variable del gen 28S del rRNA de 50 hongos de importancia médica, entre

ellos *H. capsulatum*. Las secuencias fueron utilizadas en el diseño de un par de oligonucleótidos universales capaces de amplificar una región especie-específicos de los hongos estudiados. Reid y Schafer (1999) desarrollaron un método de PCR en dos etapas para la detección de *H. capsulatum* en suelo. En la primera etapa emplearon oligonucleótidos específicos del hongo diseñados de la región espaciadora transcrita (ITS) del gen 5.8S del rRNA; y en la segunda etapa usaron oligonucleótidos específicos anidados de la misma región. Este método resultó específico y sensible, detectó hasta 10 células. Con base en secuencias del DNA ribosomal (rDNA), Lindsley *et al.* (2001) diseñaron un par de oligonucleótidos generales que amplifican el DNA de cualquier hongo dimórfico y otros pares de oligonucleótidos específicos para cada hongo. Los amplicones de la PCR se detectaron colorimétricamente en un formato de ensayo inmunoenzimático (PCR-EIA). El ensayo fue específico y su sensibilidad fue de 3.2 pg de DNA. Bialek *et al.* (2002) desarrollaron una PCR anidada para detectar *H. capsulatum* en tejido humano, usando como blanco de amplificación el gen que codifica para una proteína de 100 KDa. Este gen tiene un papel esencial en la supervivencia de *H. capsulatum* en células humanas pero no se sabe si se encuentra presente en el genoma de otros hongos dimórficos. Este ensayo fue 100% específico y sensible. Bracca *et al.* (2003) también desarrollaron una PCR anidada para el diagnóstico de la histoplasmosis utilizando sondas diseñadas a partir de la secuencia completa del gen del antígeno H de *H. capsulatum*; los autores probaron su especificidad con DNA de varios hongos y bacterias patógenas asociadas a enfermedades respiratorias; sus resultados confirmaron que la sonda es específica y sensible, detecta menos de 10 levaduras en las muestras clínicas, sin presentar resultados falsos positivos.

Matos-Guedes *et al.* (2003) eligieron regiones del gen que codifica para el antígeno inmunodominante M de *H. capsulatum* para diseñar oligonucleótidos útiles en la identificación del hongo. Esta sonda identificó correctamente aislados de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes, animales y de suelo, además de un aislado de *H. capsulatum* var. *duboisii*, pero no identificó a la var. *farcinosum*. Los autores reportaron que la sonda no reconoce el DNA de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida* spp., *Sporothrix schenckii*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *Aspergillus niger* ni *A. fumigatus*. Martagon-Villamil *et al.* (2003), diseñaron una PCR en tiempo real para *H. capsulatum*, con ésta se identificaron correctamente 34 aislados del hongo y también lo detectaron directamente en tres muestras clínicas de pacientes que presentaron cultivo positivo. Ueda *et al.* (2003) utilizaron la PCR anidada en el



diagnóstico de la histoplasmosis canina en Japón, sus oligonucleótidos fueron diseñados con base en las secuencias parciales del gen 5.8S-ITS e ITS1-5.8S-ITS del rRNA de *H. capsulatum*, que se encuentran depositadas en el GenBank, logrando así la identificación del hongo en muestras biológicas conservadas en parafina, sin mostrar falsos positivos con *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*. Buitrago *et al.* (2007) utilizaron como blanco de amplificación una porción de la región ITS1 del rDNA para diseñar oligonucleótidos para detectar al hongo por medio de una PCR en tiempo real. Por la rapidez, especificidad y sensibilidad de esta modalidad de PCR, se ha propuesto como excelente alternativa diagnóstica de la histoplasmosis, especialmente en pacientes con SIDA. Pounder *et al.* (2006) desarrollaron una PCR con base en la amplificación de secuencias repetitivas, no codificantes (rep-PCR). La identificación del patógeno se realizó por comparación de los patrones polimórficos obtenidos contra una base de datos; estos autores demostraron también la diversidad genética que hay entre los aislados de *H. capsulatum*. Tang *et al.* (2006) propusieron un ensayo de PCR-EIA para detectar al patógeno en muestras de orina usando oligonucleótidos obtenidos de regiones del rDNA. La especificidad de esta técnica fue del 100%; sin embargo, su sensibilidad resultó escasa, por lo que se limita su uso en el diagnóstico de la histoplasmosis diseminada.

No obstante que existe un gran número de sondas reportadas en la literatura, es necesario contar con marcadores específicos de amplia distribución, es decir que reconozcan a *H. capsulatum* de cualquier área geográfica, una vía para obtener este tipo de herramientas es a través del análisis de los patrones generados por RAPD-PCR. Esta técnica emplea oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria que se alinean a regiones múltiples del DNA, produciendo patrones de identificación molecular. Recientemente, el RAPD-PCR se ha utilizado para generar marcadores SCAR, los cuales difieren de los RAPD en que sus oligonucleótidos son específicos, ya que son diseñados con base en una secuencia conocida del genoma del organismo en estudio y pueden representar un solo locus en el genoma. Por lo tanto este método es una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos en la amplificación específica de DNA en mezclas de hongos (Abbasi *et al.*, 1999). En diferentes áreas de la investigación se han utilizado este tipo de marcadores, destacando los trabajos de Li *et al.* (1999), quienes obtuvieron un marcador SCAR de *Verticillium dahlie* que les permitió el establecimiento de un ensayo competitivo y cuantitativo para la detección de

este hongo por PCR. Abbasi *et al.* (1999) eligieron tres marcadores RAPD-PCR del hongo *Trichoderma hamatum*, utilizado en control biológico, con el objetivo de convertirlos en marcadores SCARs para la identificación y monitoreo directo de este organismo en composta adicionada con dicho agente, sin necesidad de aislar previamente al hongo. Weber *et al.* (2002) también generaron este tipo de marcadores para la identificación y evaluación de la progenie de la cepa *Laccaria bicolor* en micorrizas establecidas dentro de plantíos de abeto, así como para la tipificación de cepas americanas y europeas. De la misma manera, Castrillo *et al.* (2003) consiguieron detectar y estimar la densidad de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en muestras de campo, usando oligonucleótidos específicos diseñados a partir de marcadores RAPDs, los cuales detectaron hasta 100 pg de DNA genómico de dicho hongo. Xu *et al.* (2001; 2003) obtuvieron marcadores SCAR a partir del Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), estrechamente ligados al gen *Vf* de la manzana, el cual le confiere resistencia a la roña causada por el hongo *Venturia inaequalis*. De todos los marcadores que generaron, tres fueron inseparables al gen *Vf*, uno se localizó corriente abajo y siete permanecieron corriente arriba del gen *Vf*, por lo que esto les permitió construir un mapa con base en la clonación y secuenciación de dichos marcadores, además les permitió seleccionar cultivos de manzana resistentes a la roña. De ahí que estos marcadores sean una herramienta útil en la identificación de microorganismos.

Desde hace algunos años se están realizando trabajos de genotipificación molecular, de aislados de *H. capsulatum* procedentes de MX, EUA, Colombia (CO), Guatemala (GT), Panamá (PA) y Argentina (AR), empleando RAPD-PCR. Los aislados se han obtenido de pacientes con o sin SIDA, de murciélagos naturalmente infectados, así como de guano de murciélagos o de aves (Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 1997b; 2000a; 2000c; 2002). Con base en los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR y de acuerdo con el análisis de similitud, estos trabajos sugirieron que los aislados de MX formaban un grupo variable y diferente al de las cepas procedentes de otros países; asimismo, todos estos aislados revelaron la presencia de una banda de 1.2 Kb. Esta banda fue idónea para el diseño de dos marcadores específicos tipo SCAR para *H. capsulatum*: 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, de 220 y 230 bp, respectivamente. En ensayos preliminares, estos marcadores revelaron una buena especificidad, sensibilidad (detectaron hasta 1 pg de DNA) y reproducibilidad

que podrían apoyar su utilización en la identificación molecular del hongo, con aplicación diagnóstica y epidemiológica (Frías De León, 2004).

Creemos que estas sondas pueden ser de gran utilidad para la identificación universal del patógeno, ya que identifican a los aislados de MX y de otros países.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a la gran variabilidad genotípica que existe entre los aislados de *H. capsulatum* procedentes de diferentes zonas geográficas (Keath *et al.*, 1992; Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 2000a; Pounder *et al.*, 2006), es necesario contar con marcadores moleculares específicos que nos permitan detectar e identificar al patógeno en muestras clínicas y de ambientes naturales de manera rápida e inequívoca. Recientemente, se ha destacado el uso de marcadores SCARs derivados de bandas polimórficas generadas por RAPD-PCR (Abbasi *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2002; Castrillo *et al.*, 2003). Este tipo de marcadores son considerados a partir de una banda de DNA repetitivo y se diseñan con base en una secuencia conocida del genoma del organismo en estudio, lo cual los convierte en excelentes herramientas para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos (Li *et al.*, 1999). Por ello, consideramos que los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> pueden ser buenos marcadores de apoyo para el diagnóstico de la histoplasmosis y para estudios epidemiológicos en nuestro país. No obstante, antes de aplicarlos es imprescindible realizar una comparación de la eficiencia de estos SCARs con otro marcador molecular ya reportado en la literatura y que tenga características similares a los SCARs. Para el estudio comparativo se seleccionó la sonda del antígeno M (Matos-Guedes *et al.*, 2003), ya que es un marcador de un antígeno inmunodominante de *H. capsulatum*.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la gran variabilidad genotípica que existe entre los aislados de *H. capsulatum* procedentes de diferentes zonas geográficas (Keath *et al.*, 1992; Kasuga *et al.*, 1999; 2003; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 2000a; Pounder *et al.*, 2006), es necesario contar con marcadores moleculares específicos que nos permitan detectar e identificar al patógeno en muestras clínicas y de ambientes naturales de manera rápida e inequívoca. Recientemente, se ha destacado el uso de marcadores SCARs derivados de bandas polimórficas generadas por RAPD-PCR (Abbasi *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2002; Castrillo *et al.*, 2003). Este tipo de marcadores son considerados a partir de una banda de DNA repetitivo y se diseñan con base en una secuencia conocida del genoma del organismo en estudio, lo cual los convierte en excelentes herramientas para el desarrollo de ensayos sensibles y diagnósticos (Li *et al.*, 1999). Por ello, consideramos que los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> pueden ser buenos marcadores de apoyo para el diagnóstico de la histoplasmosis y para estudios epidemiológicos en nuestro país. No obstante, antes de aplicarlos es imprescindible realizar una comparación de la eficiencia de estos SCARs con otro marcador molecular ya reportado en la literatura y que tenga características similares a los SCARs. Para el estudio comparativo se seleccionó la sonda del antígeno M (Matos-Guedes *et al.*, 2003), ya que es un marcador de un antígeno inmunodominante de *H. capsulatum*.

## JUSTIFICACIÓN

Existen numerosas pruebas de laboratorio para la identificación de *H. capsulatum*; sin embargo, todas presentan limitaciones, especialmente en pacientes con inmunosupresión, por lo que es indispensable disponer de marcadores moleculares bien evaluados y caracterizados que nos permitan la detección del patógeno, ya que en MX se carece de este tipo de herramientas para detectar o confirmar la identificación del hongo. A pesar de que se han reportado en la literatura varias sondas moleculares de *H. capsulatum*, todas tienen ciertos inconvenientes, ya sea intrínsecos (sensibilidad, especificidad, variabilidad genética) o extrínsecos (costo, tecnología utilizada, etc.), por lo que la búsqueda de nuevos marcadores más accesibles es necesaria.

La valoración de los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> nos permitirá ofrecer confiadamente una herramienta útil a distintos laboratorios intra-hospitalarios para apoyar el diagnóstico de la histoplasmosis, así como contribuir en estudios epidemiológicos de la enfermedad en el país, definiendo áreas endémicas y epidémicas de mayor o menor riesgo de infección, mediante la detección molecular del patógeno en muestras de suelo.

## **HIPÓTESIS**

Los marcadores SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, diseñados a partir de la banda de 1.2 Kb generada por RAPD-PCR de aislados y cepas de *H. capsulatum* procedentes de distintas regiones geográficas, detectan eficazmente al hongo en muestras clínicas y de ambientes naturales.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los parámetros de especificidad y sensibilidad de los marcadores SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> frente a diferentes muestras clínicas y de ambientes naturales, y comparar su eficiencia con respecto a la sonda del antígeno M.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Confirmar la especificidad de los marcadores SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, por medio de Southern blot de los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR e hibridación con las sondas de 220 y 230 bp.

2. Valorar, por PCR, la especificidad de los marcadores SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, utilizando DNA de aislados de *H. capsulatum*, así como de organismos relacionados y no relacionados como: *P. brasiliensis*, *C. immitis*, *S. schenckii*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. albicans* y humano.

3. Valorar los marcadores SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> con DNA extraído de tejidos de mamíferos infectados, natural o experimentalmente, con *H. capsulatum* y con DNA extraído de muestras clínicas y de ambientes naturales (suelo, guano de murciélagos) posiblemente contaminadas con el hongo.

4. Comparar la especificidad y la sensibilidad de los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> con respecto a la eficiencia de la sonda diseñada a partir de la secuencia el antígeno M de *H. capsulatum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aislados y DNAs fúngicos.** Se trabajó con 40 DNAs de aislados y cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. El origen geográfico y la fuente de éstos se especifican en la tabla 1. Los aislados y cepas, pertenecen a la “Colección de Cepas de *H. capsulatum*” del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>).

Para evaluar la especificidad de los marcadores moleculares, se ensayaron DNAs de diversos hongos patógenos: dos de *P. brasiliensis*, cuatro de *A. fumigatus*, uno de *A. niger*, uno de *C. immitis*, uno de *C. albicans*, uno de *S. schenckii*, tres de *C. neoformans*, así como cuatro de humano (Tabla 2).

**Tabla 1.** Aislados y cepas de *H. capsulatum*

No. Registro	Acrónimo	Origen	Fuente de aislamiento
EH-53	5033	MX	Humano
EH-316	6006	MX	Humano
EH-323	6010	MX	Humano
EH-324	6023	MX	Humano
EH-325	6032	MX	Humano
EH-326	1176	MX	Humano
EH-327	6064	MX	Humano
EH-328	6059	MX	Humano
EH-331	G-186B	PA	Humano
EH-333	L-100-91	GT	Guano/ave
EH-335	G-217B	EUA	Humano
EH-336	Downs	EUA	Humano
EH-355	EH-91	MX	Humano
EH-356	EH-92	MX	Humano
EH-357	EH-94	MX	Humano
EH-359	1443	MX	Humano
EH-362	Cepa 2	GT	Guano/ave
EH-363	Cepa 3	GT	Humano
EH-372	M-237	MX	Murciélago
EH-373	M-234	MX	Murciélago
EH-374	M-236	MX	Murciélago
EH-375	M-238	MX	Murciélago
EH-376	M-245	MX	Murciélago
EH-377	M-243	MX	Murciélago
EH-383H	M-254H	MX	Murciélago
EH-384H	M-267H	MX	Murciélago
EH-391	M-256	MX	Murciélago
EH-393	M-305B	MX	Murciélago
EH-408H	M-349H	MX	Murciélago
EH-418	951539	AR	Humano
EH-536	LA	CO	Humano
EH-538	Gli	CO	Humano
EH-539	DS	CO	Humano
EH-542	RG	CO	Humano
EH-549	1559	AR	Humano
EH-554B	S-164(RB)	MX	Suelo/guano
EH-560	1733	AR	Humano
EH-561	1734	AR	Humano
EH-580	1735	AR	Humano
EH-582	1737	AR	Humano

<http://www.histoplas-mex.unam.mx>

MX: México, PA: Panamá, GT: Guatemala, EUA: Estados Unidos de América, AR: Argentina, CO: Colombia



**Tabla 2.** Otros DNAs fúngicos utilizados

No. Registro	Especie	Origen
951744	* <i>A. fumigatus</i>	AR
951746	* <i>A. fumigatus</i>	AR
191	* <i>A. fumigatus</i>	MX
64	* <i>A. fumigatus</i>	MX
16826	<i>P. brasiliensis</i>	CO
41620	<i>P. brasiliensis</i>	BR
19072	<i>C. immitis</i>	MX
198298	<i>A. niger</i>	MX
88	** <i>C. neoformans</i>	MX
WM148	** <i>C. neoformans</i>	AU
936	** <i>C. neoformans</i>	CO
CA07	<i>C. albicans</i>	MX
EH-193	<i>S. schenckii</i>	MX

Banco de DNAs del Lab. Micología Molecular, Depto. Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM.

\*DNAs proporcionado por la M en C. Esperanza Duarte. Lab. Micología Molecular, Depto. Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM.

\*\*DNA proporcionado por la Dra. Rocío Castañón.Olivares. Lab. Micología Médica, Depto. Microbiología y Parasitología, Fac. Medicina, UNAM.

AR: Argentina, MX: México, CO: Colombia, BR: Brasil, AU: Australia.

**Muestras de tejidos.** Se analizaron 17 muestras de tejido obtenidas de pacientes (Tabla 3), con signos compatibles con histoplasmosis. Como testigos negativos se emplearon DNAs de muestras de sangre de humano.

Se utilizaron también nueve muestras de diferentes órganos obtenidas de ratones y murciélagos infectados experimentalmente con *H. capsulatum* (Tabla 4); 10 muestras de tejido de animales infectados de forma natural (Tabla 5). Como testigo negativo se utilizó DNA de murciélago y de ratón (no infectados).

**Muestras de suelo.** Se analizaron 10 muestras de suelo estériles y libres de guano o excretas de aves, contaminadas experimentalmente con *H. capsulatum* (Tabla 6); 10 muestras de guano de murciélagos en cautiverio infectados con el hongo durante ensayos de DL50 (Tabla 7) y 13 muestras de guano colectadas en zonas endémicas de MX (Tabla 8). Las muestras de guano provienen de la Colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Como testigo negativo se empleó suelo colectado en una zona que no reúne las condiciones ambientales para el desarrollo del hongo.

**Tabla 3.** Muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis

No. Registro	Muestra clínica
1261-B	No determinada
1261-E	No determinada
776923	≠Hígado
Sin registro	Hígado
Sin registro	Ganglio
7636/03	*Piel
7996/03	*Hígado
9069/03	*Piel
3440/04	*Tejido ovárico
05-9656	*Piel
777559	≠Médula ósea
02-9885	*Ganglio cervical
02-5494	*Ganglio submandibular
04-2562	*Masa en cuello
05-7410	*Ganglio
06-4709	*Ganglio
06-10196	*Pulmón

\*Proporcionadas por el Dr. Jorge O. García Méndez. Departamento de Infectología. Instituto Nacional de Cancerología, INCan.

≠Muestras presentaron serología negativa para *H. capsulatum*.

**Tabla 4.** Tejidos de animales experimentalmente infectados con *H. capsulatum*

Animal	Tejido	Aislado
Murciélago <i>Artibeus hirsutus</i>	Hígado e intestino	EH-315
Murciélago <i>Artibeus hirsutus</i>	Hígado e intestino	EH-375
Ratón BALB/c	Hígado e intestino	EH-375
Ratón BALB/c	Hígado e intestino	EH-380
Ratón BALB/c	Hígado e intestino	EH-381
Ratón BALB/c	Hígado e intestino	EH-378
Ratón BALB/c	Hígado e intestino	EH-382
Ratón BALB/c	Hígado e intestino	EH-359
Ratón BALB/c	Bazo y pulmón	EH-306

Los tejidos pertenecen a La Colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Depto. de Microbiología y Parasitología, Fac. Med., UNAM.

**Tabla 5.** Tejidos de animales naturalmente infectados con *H. capsulatum*

<b>Animal</b>	<b>Tejido</b>	<b>Origen</b>
Leopardo	Bazo	Zoológico de Querétaro, QT.
Mara	Bazo	African Safari Puebla, PL.
Mara	Hígado	African Safari Puebla, PL.
Ualabi	Hígado	ES
Ualabi	Pulmón	ES
Ualabi	Páncreas	ES
Ualabi	Ganglio	ES
Ualabi	Riñón	ES
Ualabi	Intestino	ES
Ualabi	Mucosa gástrica	ES

Los tejidos pertenecen a La Colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Depto. de Microbiología y Parasitología, Fac. Med., UNAM.

QT: Querétaro, PL: Puebla, ES: España.

**Tabla 6.** Muestras de suelo contaminadas experimentalmente con micelio de *H. capsulatum*

<b>No. Registro</b>	<b>Dilución de micelio</b>
S-000	0
S-001	1:10
S-002	1:15
S-003	1:20
S-004	1:30
S-005	1:50
S-006	1:70
S-007	1:100
S-008	1:200
S-009	1:300
S-010	1:500

Las muestras de suelo fueron colectadas de una jardinera que no reunía las condiciones ambientales para el desarrollo de *H. capsulatum*.

**Tabla 7.** Muestras de guano de murciélagos mantenidos en cautiverio e infectados experimentalmente con *H. capsulatum*

Especie de murciélago	Concentración	Tiempo de colecta
<i>A. hirsutus</i>	concentrado	1 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	dilución 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>	1 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	dilución 10 <sup>-3</sup> y 10 <sup>-4</sup>	1 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	concentrado	3 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	dilución 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>	3 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	dilución 10 <sup>-3</sup> y 10 <sup>-4</sup>	3 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	Concentrado	4 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	dilución 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-2</sup>	4 <sup>a</sup> . Semana
<i>A. hirsutus</i>	dilución 10 <sup>-3</sup> y 10 <sup>-4</sup>	4 <sup>a</sup> . Semana

Las muestras de guano fueron colectadas a partir de ensayos de DL50, de murciélagos infectados con el aislamiento EH-375. Como control negativo se utilizó una muestra de suelo de jardinería, colectada en Ciudad Universitaria, UNAM.

**Tabla 8.** Muestras de guano colectadas en diferentes zonas endémicas del país

No. Registro	Sitio de colecta	Especie de murciélago
S-107	OC	<i>Peteronotus sp.</i>
S-064	GR	<i>Desmodus rotundus</i>
S-071	GR	<i>Mormoops megalophyla</i>
S-104	OC	<i>Balantiopteryx sp.</i>
S-091	MS	<i>Tadarida brasiliensis</i>
S-110	SL	<i>Tadarida brasiliensis</i>
S-100	MS	<i>Desmodus rotundus</i>
S-114	NL	<i>Tadarida brasiliensis</i>
S-009	Desconocido	<i>Glosophaga, Molossidae, Mormoopidae</i>
S-119	PL	<i>Balantiopteryx alicata</i>
S-211	OC	<i>Tadarida brasiliensis</i>
SE-1	GR	<i>Tadarida brasiliensis</i>
5008 (d)	Desconocido	<i>Tadarida brasiliensis</i>

Los guanos pertenecen a La Colección del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Depto. de Microbiología y Parasitología, Fac. Med., UNAM. OC: Oaxaca, GR: Guerrero, MS: Morelos, SL: San Luis Potosí, NL: Nuevo León, PL: Puebla.

## **Extracción de DNA**

**DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum*.** La biomasa de cada aislado se cosechó por filtración del crecimiento micelial desarrollado en medio GYE (glucosa 2%, extracto de levadura 1%), según lo descrito por Reyes-Montes *et al.* (1999). Para confirmar la identidad de la especie, el filtrado se concentró y se probó por IDG (inmunodifusión en gel) frente a sueros testigos positivos y negativos; sólo las biomásas con filtrados que desarrollaron una reacción positiva con el suero testigo positivo fueron usadas en la extracción de DNA. La biomasa se transfirió a un mortero y se trituró con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se adicionaron 600 µL de amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 62.5 mM EDTA, SDS 2%, β-mercaptoetanol 10%) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 15 min, al sobrenadante se le adicionó proteinasa K (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) a una concentración final de 200 µg/mL y se incubó a 56°C por 2 h. Enseguida, se agregó RNasa A (Qiagen GmbH Hilden, DE) a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó toda la noche. El DNA se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) igual al sobrenadante recuperado y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de sodio 3 M, a -20°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm, 5 min y los botones de DNA se lavaron con etanol al 70%. Finalmente, el DNA se disolvió en 50 µL de agua grado milliQ.

**DNA de tejidos.** El DNA de tejido de animales se obtuvo utilizando el DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Para extraer DNA de las muestras de sangre y médula ósea se separaron leucocitos de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf se colocaron volúmenes iguales de muestra y de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), se centrifugó a 2000 rpm por 40 min y se recuperó la fase intermedia (serie blanca) para la extracción de DNA. En el caso de los tejidos conservados en parafina, se colocaron entre 20 y 25 mg de muestra en un tubo Eppendorf y se adicionó 1 mL de xileno para eliminar la parafina. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 100%, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min, se eliminó el etanol y el tejido se incubó a 37°C durante 15 min para evaporar los residuos de etanol. El lavado se realizó dos veces para asegurar la eliminación de los residuos de xileno.

Como método alternativo para la obtención de DNA de muestras clínicas, se llevó a cabo la lisis de los tejidos con perlas de vidrio, de la siguiente manera: a una muestra de 20 mg de tejido se le agregaron 0.2 g de perlas de vidrio (0.4 a 0.6  $\mu\text{m}$ ) (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO) y se sometió a 5 ciclos de rompimiento en un aparato FastPrep FP120 BIO101 (Thenno Savant Instruments, Holbrook, NY), a una velocidad de 5.5 durante 45 s. Luego se centrifugó la muestra y se separó el sobrenadante para extraer de éste el DNA con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA se precipitó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min, el botón de DNA se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 40  $\mu\text{L}$  de agua milliQ.

**DNA de muestras de suelo.** Para la estandarización de la extracción del DNA de guano, se emplearon muestras de suelo contaminadas con micelio de un aislado de *H. capsulatum* (EH-375) como se describe a continuación: el hongo se cultivó en medio líquido GYE, a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 5 días. El cultivo se inactivó calentando a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 1 h (Reid y Schafer, 1999) y posteriormente se filtró el micelio (Reyes-Montes *et al.*, 1999). Se pesó 1 g de micelio y se disgregó en un mortero con pistilo. Se agregaron 9 mL de PBS (10 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, [pH 7.4]) y con esta suspensión (1:10 p/v) se realizaron diferentes diluciones (1:15, 1:20, 1:30, 1:50, 1:70, 1:100, 1:200, 1:300 y 1:500). Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de cada dilución en una placa de poliestireno de 96 pozos y se midió la densidad óptica con un filtro de 405 nm, en un lector LabSystem Multiskan MS (Thermo Labsystem, Franklin, MA) para medir la concentración de micelio en cada dilución. Como blanco se utilizaron 200  $\mu\text{L}$  de PBS. A continuación, once muestras de 100 mg de suelo estéril se contaminaron con 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones de micelio. Se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar durante 30 min antes de aplicar los métodos de extracción (1 y 2).

Método No 1: A 100 mg de suelo o guano, se le agregaron 900  $\mu\text{L}$  de solución salina mezclada con Tween 80 al 0.01%, se agitó en vórtex y se centrifugó a 8000 rpm, 3 min. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante y se colocaron en tubos Eppendorf con 0.2 g de perlas de vidrio (0.4 a 0.6  $\mu\text{m}$ ) (Sigma). Las muestras se procesaron cinco veces para el rompimiento de las esporas en el FastPrep FP120 BIO101 (Thenno Savant Instruments) a una velocidad de 5.5 por 45 s. Luego se centrifugó y se extrajo el DNA con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) igual al sobrenadante

recuperado. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío y 10  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M a -20° C, durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó y se lavó la pastilla de DNA con etanol al 70%, el DNA se disolvió en 50  $\mu$ L de agua milliQ y se conservó a 4°C hasta su uso.

Método No.2: Se utilizaron 100 mg de suelo o guano para extraer el DNA con el FastDNA® SPIN Kit (QBIogene, CA), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

**Determinación de la concentración de DNA.** La concentración de DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, comparando 2  $\mu$ L de DNA con diluciones de 50, 100 y 150 ng/ $\mu$ L del fago  $\lambda$  (GIBCO). Cada muestra se mezcló con 2  $\mu$ L de regulador de corrida 10X (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 25% y ficoll 400 25%) antes de colocarse en el gel.

### **Condiciones óptimas para la PCR**

**Para los marcadores SCARs.** La mezcla de reacción consistió en: 10 ng de DNA genómico, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), 1 U Taq polimerasa (Applied Biosystems) y 100 pmol/ $\mu$ L de cada oligonucleótido 1253<sub>220(Hc)</sub>-F (5'-CATTGTTGGAGGAACCTGCT-3') - 1253<sub>220(Hc)</sub>-R (5'-GAGCTGCAGGATGTTTGTG-3') y 1253<sub>230(Hc)</sub>-F (5'-GGAGCCATGACGTAAATGG-3') - 1253<sub>230(Hc)</sub>-R (5'-TATTGCCAATGGGTTTGTCA-3') (Sigma), en un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L. La amplificación se realizó en un termociclador iCycler™ (Bio-Rad, Hercules, CA) con el siguiente programa: un ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 2 min a 72°C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (10  $\mu$ g/mL). El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5 X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). El estándar de tamaño molecular empleado fue el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador Synoptics (Syngene, Cambridge).

**Para la sonda del antígeno M.** Se siguió el procedimiento reportado por Matos-Guedes *et al.* (2003). En un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L, se emplearon: 100 ng

de DNA genómico, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs (Applied Biosystems), 2.5 U Taq polimerasa (Applied Biosystems) y 20 pmol/μL de cada oligonucleótido *Msp2F* (5'-CGGGCCGCGTTTAACAGCGCC-3') - *Msp2R* (5'-ACCAGCGGCCATAAGGACGTC-3') (Sigma). El programa de amplificación fue el siguiente: un ciclo de 3 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 70°C, 1 min a 72°C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1.5%. El corrimiento de la electroforesis se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5 X. El estándar de tamaño molecular empleado fue el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador Synoptics (Syngene).

### **Análisis de la homología entre las secuencias de los marcadores SCARs**

El DNA de la cepa de referencia G-217B de *H. capsulatum* se amplificó con los oligonucleótidos SCARs (1253<sub>220(Hc)-a</sub>-1253<sub>220(Hc)-b</sub> y 1253<sub>230(Hc)-a</sub>-1253<sub>230(Hc)-b</sub>), como se especificó anteriormente. Los fragmentos amplificados de 220 y 230 bp se purificaron a partir de gel de agarosa usando el QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados se secuenciaron en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en un aparato ABI (Applied Biosystems) utilizando los oligonucleótidos con los que se generaron. Para determinar el grado de homología que existe entre las secuencias de los SCARs, éstas se editaron y alinearon entre ellas, por medio del programa BLASTN 2.2.9 (Altschul *et al.*, 1997).

### **Especificidad de los marcadores SCARs por Southern blot**

**Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).** Los DNAs de los 40 aislados de *H. capsulatum* se amplificaron por el método de RAPD-PCR con la mezcla de oligonucleótidos 1281 (5'-AACGCGCAAC-3') y 1283 (5'-GCGATCCCCA-3') y con un solo oligonucleótido 1253 (5'-GTTTCCGCCC-3') (Operon Technologies Inc. Alameda, CA), según Kersulyte *et al.* (1992), Woods *et al.* (1993), Reyes-Montes *et al.* (1999) y Taylor *et al.* (2000a). La mezcla de reacción consistió en 10 ng de DNA genómico, 100 pmoles de cada oligonucleótido, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs (Applied Biosystems) y 1 U Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems) en amortiguador 1 X, en un volumen final de 25



μL. Se utilizó el siguiente programa en un termociclador iCycler™ (Bio-Rad): un ciclo de 7 min a 94°C; seguido por 45 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C y 1 min a 72°C, se llevó a cabo una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis a 90 V en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5 X (45 mM Tris-Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA). Los amplicones se visualizaron tiñendo los geles con bromuro de etidio (10 μg/mL). Como estándar de tamaño molecular se utilizó el 123 bp DNA Ladder (Invitrogen). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador Synoptics (Syngene). Los patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR se hicieron por duplicado, una se utilizó para aislar la banda de 1.2 Kb y el otro para el Southern blot.

**Southern blot.** Los patrones polimórficos de *H. capsulatum*, generados por RAPD-PCR se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham) en un equipo Vacuum Blotter modelo 785 (Bio-Rad), de la siguiente manera: después de fotodocumentar el gel de agarosa que contenía el patrón polimórfico RAPD-PCR, se expuso a luz UV durante 5 min. Enseguida, se sumergió el gel en una solución de HCl 0.25 M durante 15 min, con agitación constante. A continuación, se eliminó el HCl y se lavó el gel con agua para eliminar el exceso de ácido. Se colocó el gel en NaOH 0.5 M por 20 min, y posteriormente se lavó con agua. Por otro lado, se colocó papel filtro Whatman No. 1 en la base del equipo Vacuum Blotter, sobre el cual se depositó la membrana de nylon y sobre ésta el gel de agarosa. Se adicionó NaOH 0.5 M y se conectó el equipo a una bomba de vacío (40 a 50 mmHg) durante 45 min para llevar a cabo la transferencia. Concluida la transferencia, se lavó la membrana con SSC 5 X (0.75 M NaCl, 75 mM citrato de sodio, [pH 7.0]) durante 5 min. La membrana se secó sobre papel filtro y se guardó a -4°C hasta que se realizó la hibridación.

**Marcaje de las sondas SCARs.** Los marcadores de DNA de 220 y 230 pb se obtuvieron por PCR de 40 aislados de *H. capsulatum* como se describió anteriormente. Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se cortaron las bandas correspondientes y se purificaron con el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Los fragmentos de DNA purificados se concentraron al vacío (Instrumental Speed Vac System AES1010) durante 2 h y se disolvieron en 30 μL de agua milliQ. La pureza y la concentración de los fragmentos se determinó por electroforesis en agarosa al 1.5%. La concentración de los SCARs se definió por comparación con diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50 ng/μL) del fago λ

(GIBCO). Cada sonda se marcó por el método no radioactivo de Random Primers Labeling of DNA Probes (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, DE) de acuerdo con la siguiente reacción: a 200 ng/4  $\mu$ L de DNA se le adicionaron 12  $\mu$ L de agua milliQ, para tener un volumen final de 16  $\mu$ L. Estas se calentaron durante 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo por 5 min, después se le adicionaron: 2  $\mu$ L de DIG DNA labeling mix 10 X, 2  $\mu$ L de la mezcla de hexanucleótidos 10 X y 1  $\mu$ L de la enzima Klenow (2 U/ $\mu$ L) y se incubó a 37°C durante toda la noche. La reacción se detuvo adicionando 2  $\mu$ L de EDTA 0.2 M, [pH 8.0].

Dot blot e hibridación. Antes de realizar las hibridaciones, se determinó la eficiencia del marcaje de las sondas SCARs, haciendo las siguientes diluciones: 1:10, 1:100, 1:1 000, 1:10 000 y 1:100 000. Se colocó 1 $\mu$ L de cada una de las diluciones en una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham), se dejó secar a temperatura ambiente y luego se expuso a luz UV (a 50 mJoule) en un GS GENE LINKER™ (Bio-Rad). Por último se detectaron por método colorimétrico (se especifica más adelante). La dilución de las sondas que reveló la señal más nítida fue la que se empleó para los ensayos de hibridación.

Hibridación. La sonda marcada con digoxigenina se ajustó a un volumen de 200  $\mu$ L con agua milliQ y se le adicionaron 2 mL de solución de prehibridación (formamida 50% [v/v], 25% SSC 20X [v/v], 0.02% SDS [p/v], 20% solución de bloqueo (Roche) [v/v], 0.1% N'-lauroylsarcosina [p/v]). La sonda se calentó a ebullición durante 5 min e inmediatamente después se colocó en hielo durante 3 min.

Preparación de la membrana de nylon. La membrana de nylon que contenía los patrones polimórficos de *H. capsulatum*, generados por RAPD-PCR se colocó dentro de un tubo de hibridación, cuidando que se adhiriera a la pared del tubo y que el lado donde se transfirió el DNA quedara hacia el interior del tubo.

Prehibridación e hibridación de las sondas. La prehibridación e hibridación se realizaron usando el DIG Wash and Block Buffer Set (Roche), como se describe a continuación: por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana se adicionaron 3.5 mL de solución de prehibridación (50% formamida [v/v], 25% SSC 20 X [v/v], 0.02% SDS [p/v], 20% solución de bloqueo (Roche) [v/v], 0.1% N'-lauroylsarcosina [p/v]), la membrana se incubó toda la noche a 45°C. Se desechó la solución de prehibridación, se colocó la solución de hibridación (solución de prehibridación adicionada con la sonda marcada) y se incubó toda la noche a la temperatura óptima para cada sonda. La temperatura de

hibridación se calculó empleando la fórmula:  $T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - 600/L$ ; L = longitud de la sonda en bp.  $T_{ópt} = T_m - 25^\circ\text{C}$ . Luego de la incubación, se recuperó la solución de hibridación y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  para usos posteriores, la membrana se lavó dos veces con 10 mL de amortiguador de baja astringencia (SSC 2 X y 0.1% SDS) y se incubó a temperatura ambiente por 5min. Se desechó la solución y posteriormente, se lavó dos veces con 10 mL de amortiguador de alta astringencia precalentado a  $65^\circ\text{C}$  (SSC 0.5 X y 0.1% SDS) y se incubó a  $45^\circ\text{C}$  por 15 min. Se lavó con 10 mL de SSC 2 X durante 3 min y se adicionaron 10 mL de solución de bloqueo y se incubó por 30 min en agitación.

Incubación con el conjugado anti-digoxigenin-AP (fosfatasa alcalina). Se retiró la solución de bloqueo y se agregó la solución del conjugado anti-digoxigenin-AP diluida (1:5000) en la solución de bloqueo por 30 min en agitación. Después se lavó la membrana dos veces con la solución de lavado durante 15 min en agitación y finalmente, se adicionó 5 mL de regulador de detección para mantener húmeda la membrana, se realizó la detección de las bandas utilizando el método colorimétrico.

Visualización de las bandas por método colorimétrico. Se mezcló la solución del sustrato, que contenía 100  $\mu\text{L}$  de NBT/BCIP stock solution (Roche), en 5 mL de buffer de detección, con ésta solución se cubrió la membrana y se colocó en agitación hasta que se percibió la hibridación por medio de la aparición de bandas coloreadas. La reacción se detuvo colocando la membrana en buffer TE (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA) durante 5 min. Las imágenes de las membranas hibridadas se capturaron en un Fotodocumentador Synoptics (Syngene).

### **Análisis de la especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M**

**Aislados homólogos y heterólogos.** Los DNAs de los aislados de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis*, *C. immitis*, *S. schenckii*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. albicans* y DNA de sangre humana se amplificaron de acuerdo con las condiciones antes mencionadas utilizando los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> y los oligonucleótidos obtenidos de la secuencia del antígeno M de *H. capsulatum* (Matos-Guedes *et al.* 2003).

**Muestras clínicas.** Los DNAs de diversas muestras clínicas colectadas de pacientes con síntomas compatibles con histoplasmosis se amplificaron con los oligonucleótidos SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, y con los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del antígeno M, según las condiciones de reacción para cada marcador. Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.

**Muestras de ambientes naturales.** Se utilizaron tejidos de animales natural o experimentalmente infectados con *H. capsulatum*, así como muestras de suelo y de guano para la extracción de DNA, el cual se amplificó con los pares de oligonucleótidos 1253<sub>220(Hc)-a</sub> - 1253<sub>220(Hc)-b</sub>; 1253<sub>230(Hc)-a</sub> - 1253<sub>230(Hc)-b</sub> y *Msp2F* - *Msp2R* (Sigma), empleando las condiciones de reacción anteriormente descritas para los marcadores. Los productos de amplificación se observaron en gel de agarosa al 1.5%.

### **Cuantificación de UFC de *H. capsulatum* en muestras de suelo, detectadas por PCR**

La biomasa micelial del aislado EH-375 de *H. capsulatum* se obtuvo como se indicó en el apartado de extracción de DNA. Se pesó 1 g de micelio y se disgregó en un mortero con pistilo. Se agregaron 9 mL de PBS (10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl [pH 7.4]) y con esta suspensión (1:10 p/v) se realizaron diferentes diluciones (1:15, 1:20, 1:30, 1:50, 1:70, 1:100, 1:200, 1:300 y 1:500). Se tomaron 10 µL de cada dilución de micelio y se sembraron por duplicado en cajas de Petri con agar mycobiotic (Bioxon, MX). Se incubaron a 28°C durante 5 días y se contaron las UFC de *H. capsulatum*, se calculó el promedio de UFC para cada dilución y se determinó el número de UFC/g de suelo detectadas por cada marcador molecular. Por otro lado, se llevó a cabo la PCR con los marcadores SCARs y con la sonda del antígeno M utilizando el DNA extraído de cada una de las diferentes diluciones de micelio.

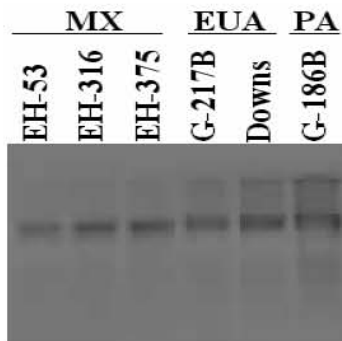
### **Análisis de la sensibilidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M**

Para la evaluación de la sensibilidad de los tres marcadores moleculares, se llevó a cabo la PCR de diferentes concentraciones de DNA de *H. capsulatum* (G-217B): 5,

2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005, 0.0025 y 0.001 ng/μL. Los productos de amplificación se visualizaron en agarosa al 1.5%.

## RESULTADOS

**DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum*.** Se obtuvo DNA de un total de 40 aislados y cepas de *H. capsulatum*, de acuerdo con el método tradicional, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. En la figura 1 se puede apreciar que la calidad del DNA obtenido fue el adecuado para los ensayos de este trabajo.



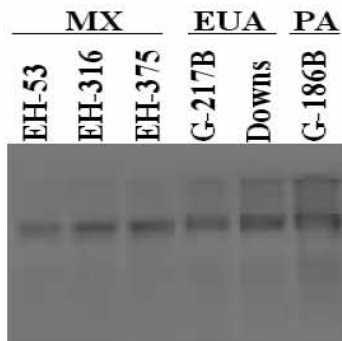
**Figura 1. Extracción de DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum* procedentes de MX, EUA y PA.** Se extrajo el DNA empleando el método tradicional fenol:cloroformo: alcohol isoamílico, como se describe en materiales y métodos.

**DNA de tejidos.** La estandarización de la obtención de DNA de muestras de ambientes naturales se realizó con 10 muestras de tejidos de ratones y murciélagos experimentalmente infectados con *H. capsulatum*. El DNA se obtuvo con el DNeasy<sup>TM</sup> Tissue Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, cuando se procesaron las muestras, se obtuvo DNA de mala calidad, por lo que se modificó el paso inicial donde se mezclaba el tejido entero del animal (20 mg) con el amortiguador de lisis, por la trituración previa del tejido (20 a 50mg) con nitrógeno líquido y amortiguador de lisis. Con esta modificación se obtuvo DNA de mejor calidad (Fig. 2B).

2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005, 0.0025 y 0.001 ng/μL. Los productos de amplificación se visualizaron en agarosa al 1.5%.

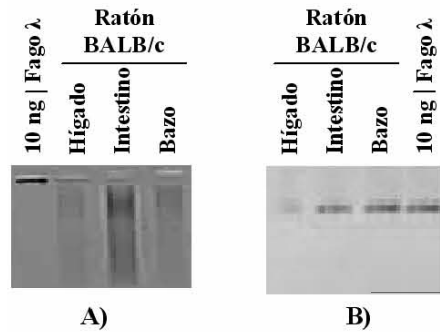
## RESULTADOS

**DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum*.** Se obtuvo DNA de un total de 40 aislados y cepas de *H. capsulatum*, de acuerdo con el método tradicional, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. En la figura 1 se puede apreciar que la calidad del DNA obtenido fue el adecuado para los ensayos de este trabajo.



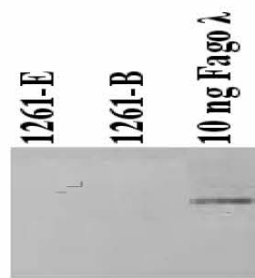
**Figura 1. Extracción de DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum* procedentes de MX, EUA y PA.** Se extrajo el DNA empleando el método tradicional fenol:cloroformo: alcohol isoamílico, como se describe en materiales y métodos.

**DNA de tejidos.** La estandarización de la obtención de DNA de muestras de ambientes naturales se realizó con 10 muestras de tejidos de ratones y murciélagos experimentalmente infectados con *H. capsulatum*. El DNA se obtuvo con el DNeasy<sup>TM</sup> Tissue Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, cuando se procesaron las muestras, se obtuvo DNA de mala calidad, por lo que se modificó el paso inicial donde se mezclaba el tejido entero del animal (20 mg) con el amortiguador de lisis, por la trituración previa del tejido (20 a 50mg) con nitrógeno líquido y amortiguador de lisis. Con esta modificación se obtuvo DNA de mejor calidad (Fig. 2B).



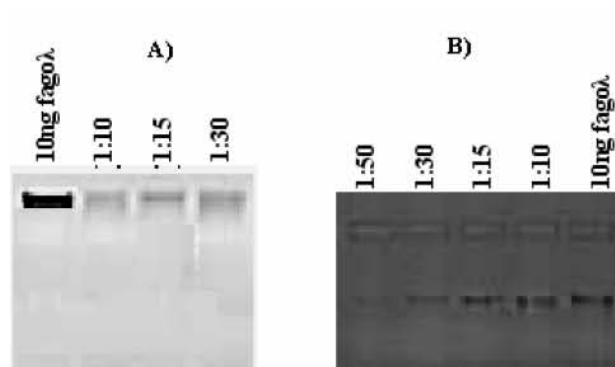
**Figura 2. Extracción de DNA de tejido de ratón con el DNeasy Tissue kit.** Extracción de DNA siguiendo las indicaciones de la casa comercial (A). Extracción de DNA procesando el tejido con nitrógeno líquido y amortiguador de lisis (B).

Cuando se realizó la obtención de DNA de muestras clínicas (tejidos) utilizando el equipo FastPrep, el rendimiento fue mínimo, ya que no fue posible visualizarlo en gel de agarosa (Fig. 3).



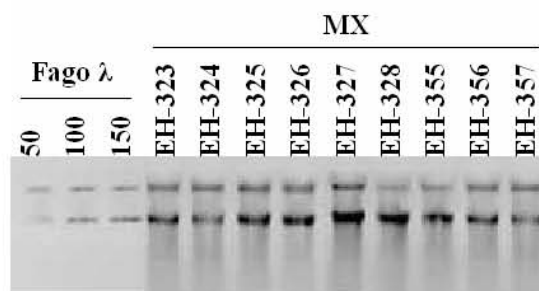
**Figura 3. Detección de DNA extraído de tejidos de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis.** La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando el equipo FastPrep, como se describe en materiales y métodos.

**DNA de muestras de suelo.** La obtención de DNA de las muestras de suelo, se efectuó por dos métodos: utilizando el equipo FastPrep y FastDNA® SPIN soil kit. La cantidad de DNA obtenida fue similar con los dos métodos (Fig. 4); sin embargo la calidad no fue la misma, el DNA obtenido por medio del FastPrep presentó gran cantidad de residuos de arcilla, mientras que con el kit se logró una mejor purificación.



**Figura 4. Obtención de DNA de muestras de suelo.** Se utilizaron dos métodos: A) FastPrep y B) FastDNA® SPIN Kit. La concentración del DNA se estimó por comparación con 10 ng de DNA del fago  $\lambda$ .

**Determinación de la concentración de DNA.** Se extrajo el DNA de los aislamientos, cepas y muestras de ambientes naturales de *H. capsulatum* de acuerdo con el método descrito. Posteriormente, se determinó la concentración de los DNAs, comparando 2  $\mu$ L de cada DNA con 50, 100 y 150 ng/ $\mu$ L del fago  $\lambda$ . La figura 5 muestra un ejemplo de la determinación de la concentración de DNA de aislados de *H. capsulatum* procedentes de MX. Después de determinar la concentración, se realizaron las correspondientes diluciones para ajustar cada DNA a 5 ng/ $\mu$ L para las amplificaciones.



**Figura 5. Determinación de las concentraciones de DNA de aislados de *H. capsulatum*.** La cuantificación se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, comparando los DNAs con diferentes concentraciones de DNA del fago  $\lambda$ .

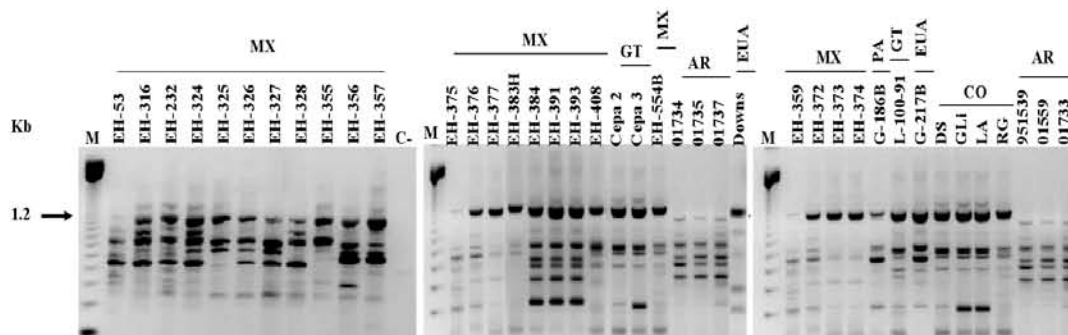


## Análisis de la homología entre la secuencias de los marcadores SCARs

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los marcadores SCARs de 220 y 230 pb, mostró que, aunque fueron diseñados a partir de un solo marcador polimórfico de RAPD, no existe homología entre ellas, demostrando que son marcadores completamente independientes.

## Especificidad de los marcadores SCARs por Southern blot

**Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR).** Cuando se analizaron los aislados y cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* por RAPD-PCR, se observó un patrón polimórfico particular dependiendo de la región geográfica de la que proceden; sin embargo, tienen en común la banda de 1.2 Kb (Fig. 6). En los aislados procedentes de AR, dicha banda casi no se percibe, pero sabemos que está presente porque los oligonucleótidos SCARs lograron amplificar también el DNA de todos los aislados de AR. Para corroborar que los marcadores SCARs reconocen la banda de 1.2 Kb de la que fueron generados los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> para la identificación del patógeno, se llevó a cabo la hibridación entre los patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR de aislados de *H. capsulatum* y los marcadores SCARs.

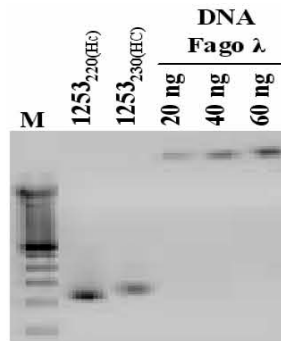


**Figura 6. RAPD-PCR de aislados y cepas de *H. capsulatum*, de diferentes orígenes geográficos.** En la figura se observa la banda de 1.2 Kb en el perfil polimórfico de todos los aislados, generados con la combinación de oligonucleótidos 1281-1283. (C-) control negativo, M- 123 bp DNA Ladder.

**Southern blot.** Los patrones polimórficos generados por RAPD-PCR con los DNAs de *H. capsulatum*, fueron transferidos a membranas de nylon para los ensayos de hibridación con las sondas de 220 y 230 pb. La transferencia se efectuó correctamente, ya que cuando se observaron

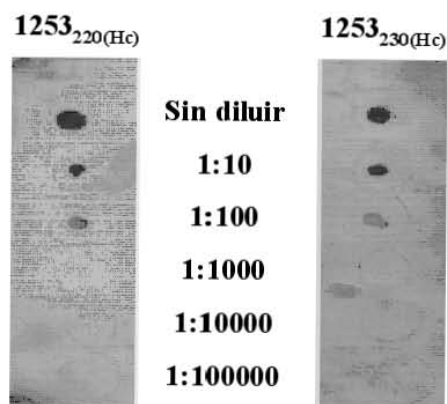
los geles con luz uv, no se encontró ninguna banda.

**Marcaje de las sondas SCARs.** Previo al marcaje de las sondas de 220 y 230 pb, éstas se obtuvieron por PCR utilizando DNA de *H. capsulatum*, posteriormente se purificaron a partir del gel de agarosa y se cuantificaron por comparación con diferentes concentraciones del fago  $\lambda$  (20, 40 y 60 ng/ $\mu$ L). La concentración para la sonda 1253<sub>220(Hc)</sub> se estimó en 60 ng/ $\mu$ L y para la sonda 1253<sub>230(Hc)</sub> en 40 ng/ $\mu$ L, concentración suficiente para el marcaje no radioactivo (digoxigenina) (Fig. 7).



**Figura 7. Obtención, purificación y cuantificación de las sondas SCARs.** La obtención y purificación de los SCARs se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. La cuantificación se realizó en electroforesis en gel de agarosa, por comparación con diferentes concentraciones del fago  $\lambda$ . M-100 bp DNA Ladder.

**Dot blot.** Se fijaron en una membrana de nylon diferentes diluciones de las sondas SCARs marcadas con digoxigenina y se revelaron por el método colorimétrico, con el propósito de seleccionar la dilución que permitió visualizar mejor la sonda (Fig. 8). Las soluciones que dieron mejores resultados fueron la concentrada y las diluciones 1:10 y 1:100. Para realizar los ensayos de hibridación se seleccionó la solución de la sonda sin diluir.



**Figura 8. Curva de eficiencia de marcaje de los SCARs con digoxigenina.** Para valorar la eficiencia del marcaje de los SCARs se hizo un ensayo de Dot blot con las diferentes diluciones. Las sondas 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, se marcaron con digoxigenina y se revelaron por método colorimétrico.

Hibridación con las sondas 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>. Los ensayos de hibridación se llevaron a cabo para confirmar que las bandas de 220 y 230 bp estaban presentes en los DNAs de todos los aislados y cepas de *H. capsulatum*; así como para investigar si los marcadores SCARs se encuentran en una sola o en múltiples copias dentro del genoma del hongo. Se encontró que la temperatura de hibridación (38°C) para la sonda 1253<sub>220(Hc)</sub> y para la sonda 1253<sub>230(Hc)</sub> (39°C) calculadas según la fórmula descrita en Materiales y Métodos, resultó adecuada para los ensayos de hibridación.

Las sondas 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> hibridaron con la banda de 1.2 Kb del patrón polimórfico obtenido por RAPD-PCR de todos los aislados y cepas de *H. capsulatum*, incluso en los patrones polimórficos de los aislados procedentes de AR donde esta banda no se visualiza (Fig. 9), lo que demuestra la especificidad de estos marcadores SCAR en la identificación de *H. capsulatum*.

Además estos resultados revelaron que las secuencias de los marcadores están presentes en una sola copia dentro del genoma del hongo, no obstante que los ensayos de hibridación se realizaron en condiciones de baja astringencia.

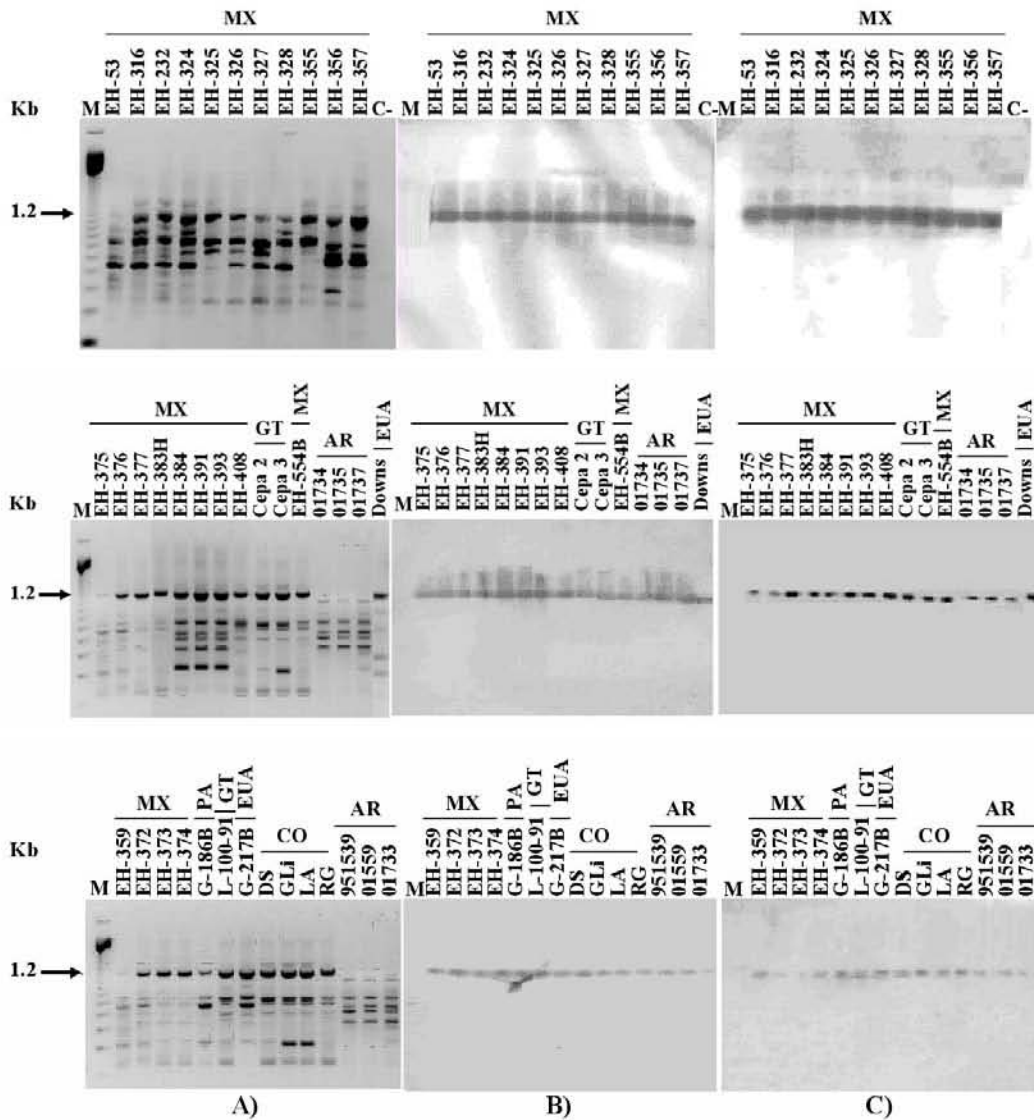
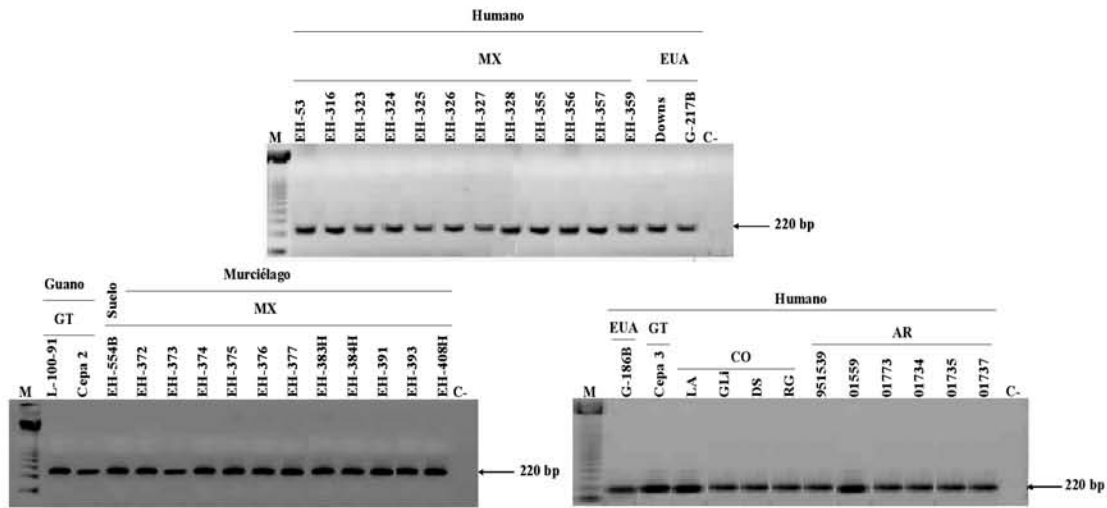


Figura 9. Hibridación de los patrones polimórficos por RAPD-PCR de aislados y cepas de *H. capsulatum* con las sondas SCARs. A) patrones polimórficos obtenidos por RAPD-PCR, B) hibridación de la sonda 1253<sub>220</sub>(H<sub>c</sub>), C) hibridación de la sonda 1253<sub>220</sub>(H<sub>c</sub>).

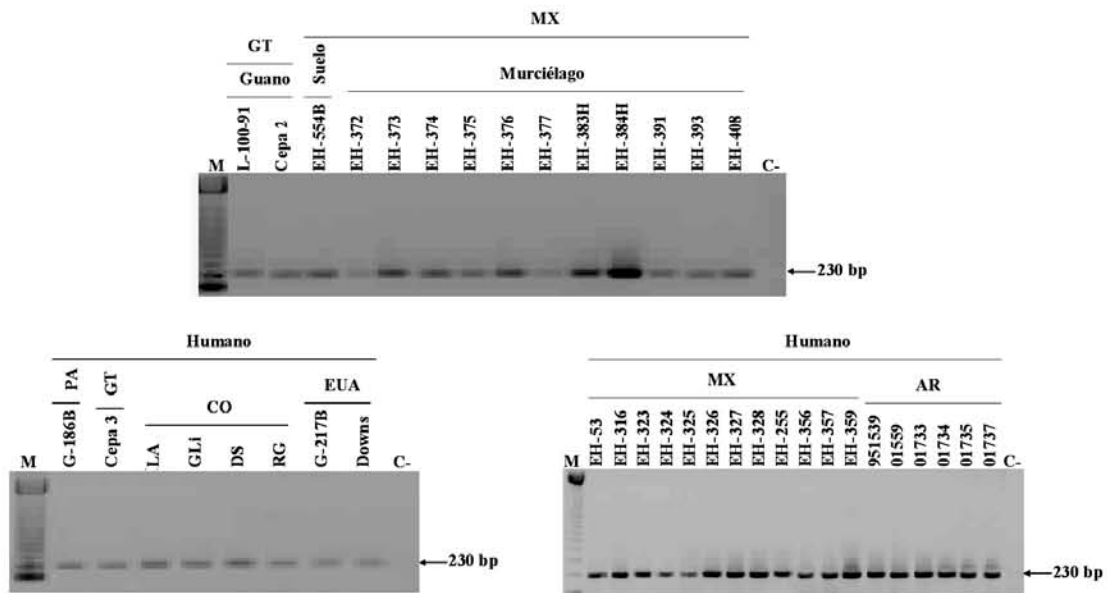
### Análisis de la especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M

**Aislados homólogos.** Los oligonucleótidos correspondientes a los marcadores SCARs 1253<sub>220</sub>(H<sub>c</sub>) y 1253<sub>230</sub>(H<sub>c</sub>) amplificaron las bandas de 220 y 230 bp respectivamente de todos los DNAs de los aislados de *H. capsulatum* que se probaron (Figs. 10 y 11). Estos resultados se obtuvieron incluso a temperaturas de alineamiento

poco astringentes (50°C).



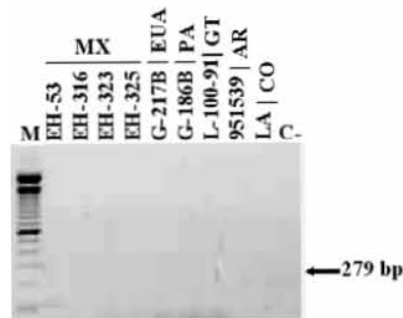
**Figura 10. PCR con el marcador SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc).** Se utilizó DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum* obtenidos de diferentes fuentes y origen geográfico. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.



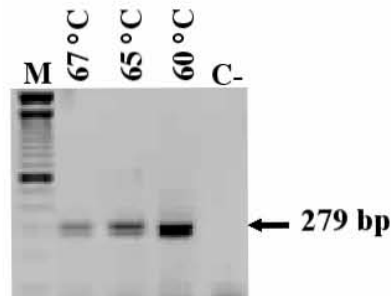
**Figura 11. PCR con el marcador SCAR 1253<sub>230</sub>(Hc).** Se utilizó DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum* obtenidos de diferentes fuentes y origen geográfico. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

La especificidad de la sonda del antígeno M se determinó por PCR, de acuerdo con las condiciones de reacción establecidas por Matos-Guedes *et al.* (2003); sin

embargo, para identificar todos los aislados de *H. capsulatum* fue necesario modificar dos parámetros: temperatura de alineamiento y concentración de DNA. Matos-Guedes *et al.* (2003) describen que sus ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de alineamiento de 70°C y utilizando 100 ng de DNA, pero al probarse el DNA de *H. capsulatum* en esas condiciones no obtuvimos ninguna amplificación (Fig. 12). Por esta razón, se realizó una curva de temperaturas de alineamiento con el propósito de encontrar la óptima. Las temperaturas que se probaron fueron 60, 65 y 68°C y la mejor amplificación se obtuvo con 60°C (Fig. 13), por lo que se eligió para todos los ensayos.



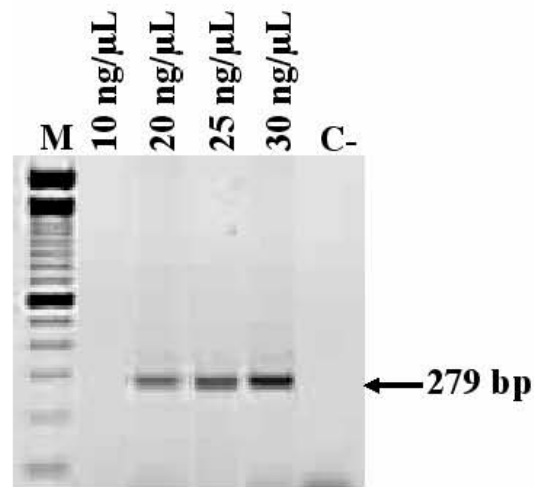
**Figura 12. PCR con la sonda del antígeno M.** Se utilizó DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum* de diferentes fuentes y origen geográfico, de acuerdo con las condiciones establecidas por Matos-Guedes *et al.* (2003). (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.



**Figura 13. Curva de temperatura de alineamiento para la sonda del antígeno M.** Se utilizó un DNA de *H. capsulatum* (EH-375) para amplificarlo a diferentes temperaturas (60, 65 y 67°C), utilizando las condiciones ya establecidas para la mezcla de reacción. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

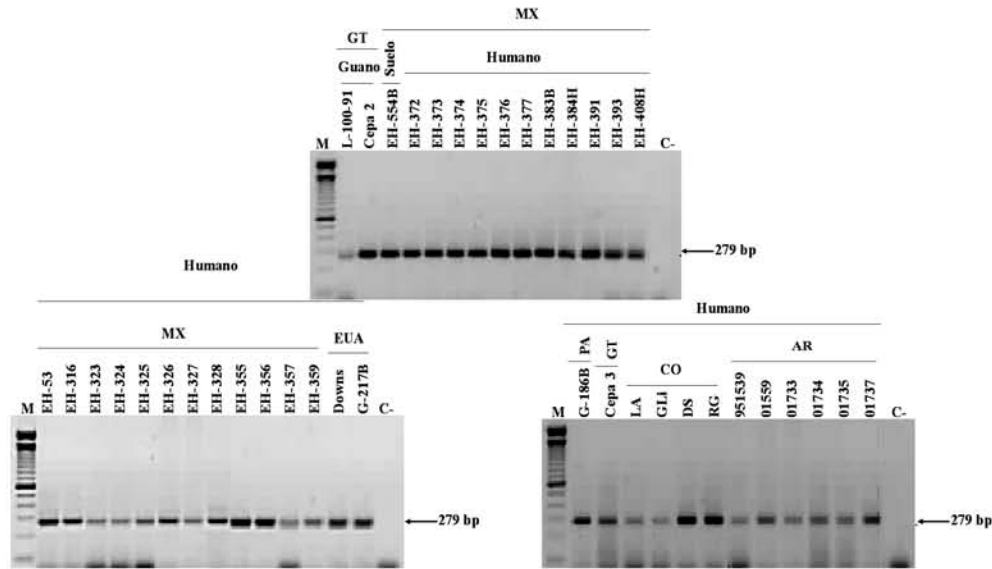
Por otro lado con la concentración de DNA que reportó Matos-Guedes *et al.*, (2003) (100ng/μL), no se obtuvo ningún amplicón, por lo que fue necesario hacer una curva de concentración de DNA (10, 20, 25 y 30 ng/μL) y se encontró que la

concentración de 30 ng/μL fue la adecuada para obtener una buena amplificación (Fig.14).



**Figura 14. Curva de concentraciones de DNA para la sonda del antígeno M.** Se utilizó un DNA de *H. capsulatum* (EH-375) para amplificarlo con diferentes concentraciones de DNA (10, 20, 25 y 30 ng/μL). (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

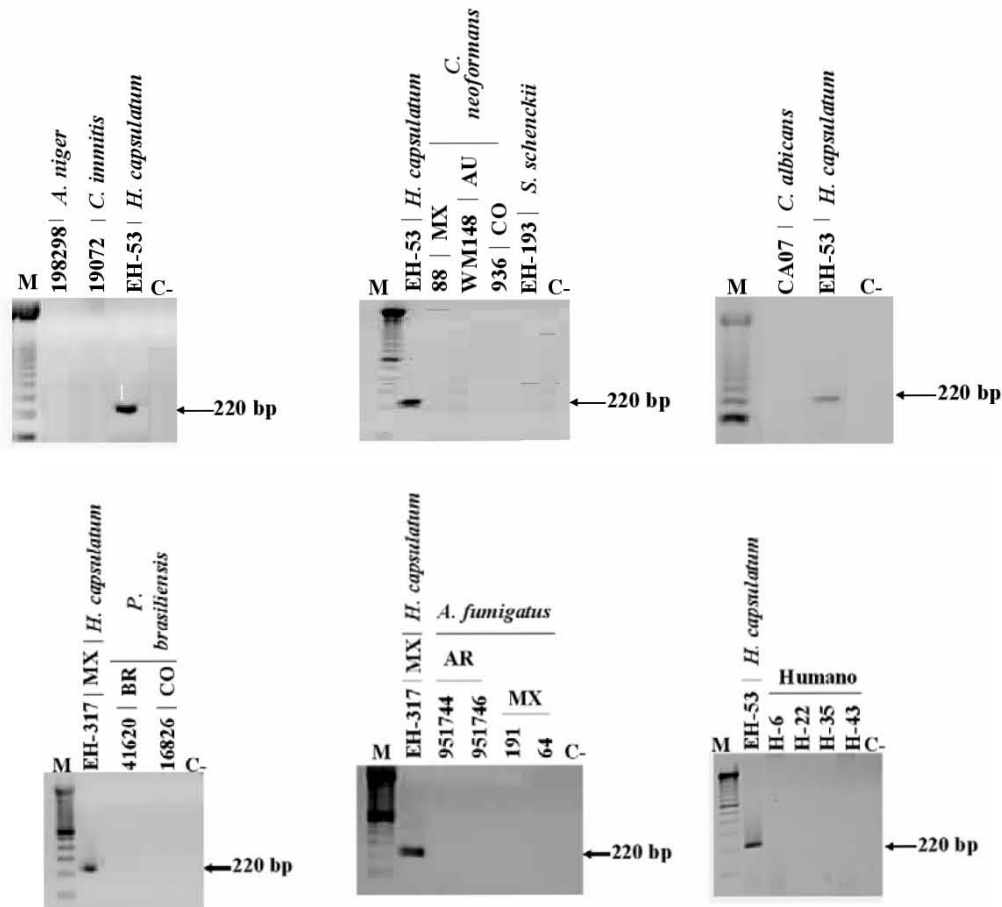
Una vez ajustados los parámetros de temperatura y concentración de DNA, se amplificaron los DNAs de todos los aislados de *H. capsulatum*, los cuales revelaron una sola banda del tamaño esperado (279 bp). Esto demostró que la sonda del antígeno M, igual que los SCARs, es una herramienta de amplio reconocimiento para aislados de *H. capsulatum* procedentes de MX, GT, CO, AR, EUA y PA (Fig. 15).



**Figura 15. PCR con las condiciones óptimas para la sonda del antígeno M.** La amplificación del DNA de aislados y cepas de *H. capsulatum* de diferentes fuentes y orígenes geográficos se llevó a cabo con las condiciones óptimas para la PCR. (C-) control negativo, M- 100 bp DNA Ladder.

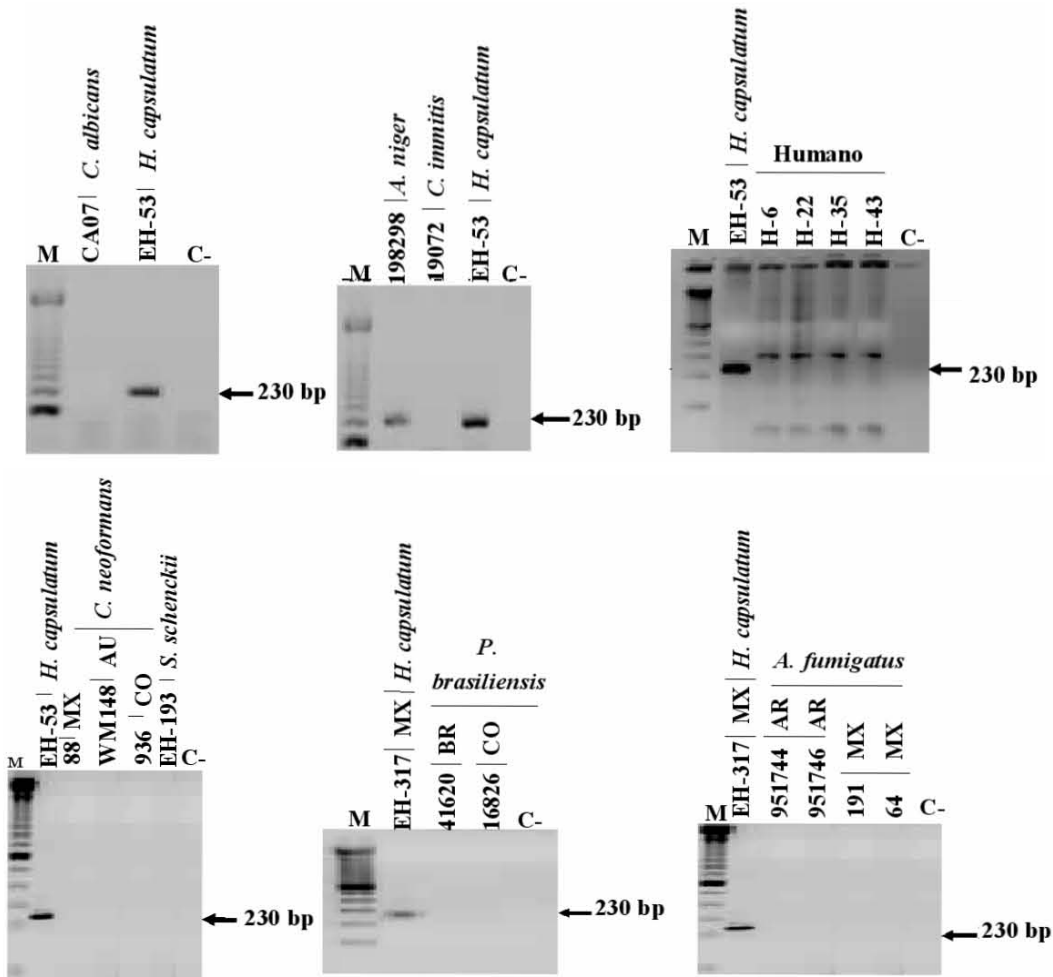
**Aislados heterólogos.** Para probar la especificidad de los tres marcadores moleculares, se utilizaron DNAs de microorganismos heterólogos y humano. El SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc) resultó 100 % específico para *H. capsulatum*, ya que al amplificar el DNA de *P. brasiliensis*, *C. immitis*, *S. schenckii*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. albicans* y humano, no se observó ningún amplicón (Fig. 16). Estos resultados se confirmaron al realizar ensayos con diferentes concentraciones de DNA (0.5 a 20 ng/μL) y de MgCl<sub>2</sub> (0.5 a 2.5 mM), así como temperaturas de alineamiento variables (50 a 63°C).





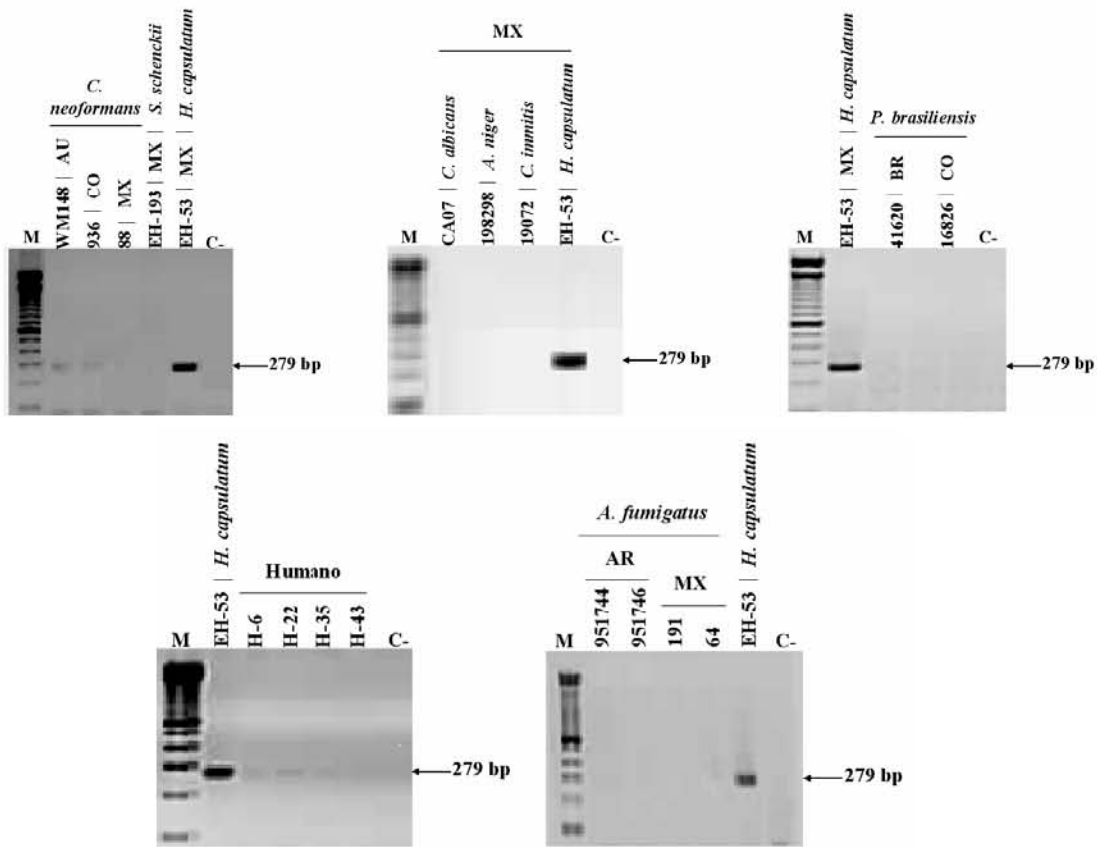
**Figura 16. Especificidad del marcador SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub>.** Se utilizaron hongos heterólogos para *H. capsulatum* y DNA de tejido de humano, para llevar a cabo la PCR, aplicando las condiciones establecidas para este marcador. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

El marcador 1253<sub>230(Hc)</sub> resultó inespecífico con el DNA del hongo heterólogo *A. niger* (Fig. 17). No obstante que se realizaron ensayos de PCR utilizando temperatura de alineamiento elevada (63°C) y bajas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM), siempre se amplificó la banda de 230 bp con DNA de *A. niger*. En el caso del DNA humano, no se observó la banda de 230 bp, pero se observaron varias bandas de mayor tamaño.



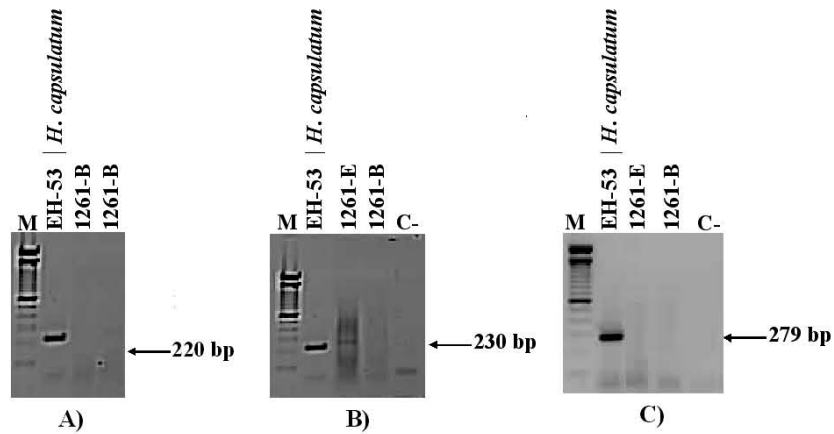
**Figura 17. Especificidad del marcador SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub>.** Se utilizaron DNAs de hongos heterólogos para *H. capsulatum* y DNA de tejido de humano aplicando las condiciones establecidas para la PCR con este marcador. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

La sonda del antígeno M resultó inespecífica para *H. capsulatum* porque amplificó dos de tres DNAs de *C. neoformans*; y dos de cuatro DNAs de humano. Con los demás microorganismos heterólogos analizados no se observó ninguna amplificación (Fig. 18).



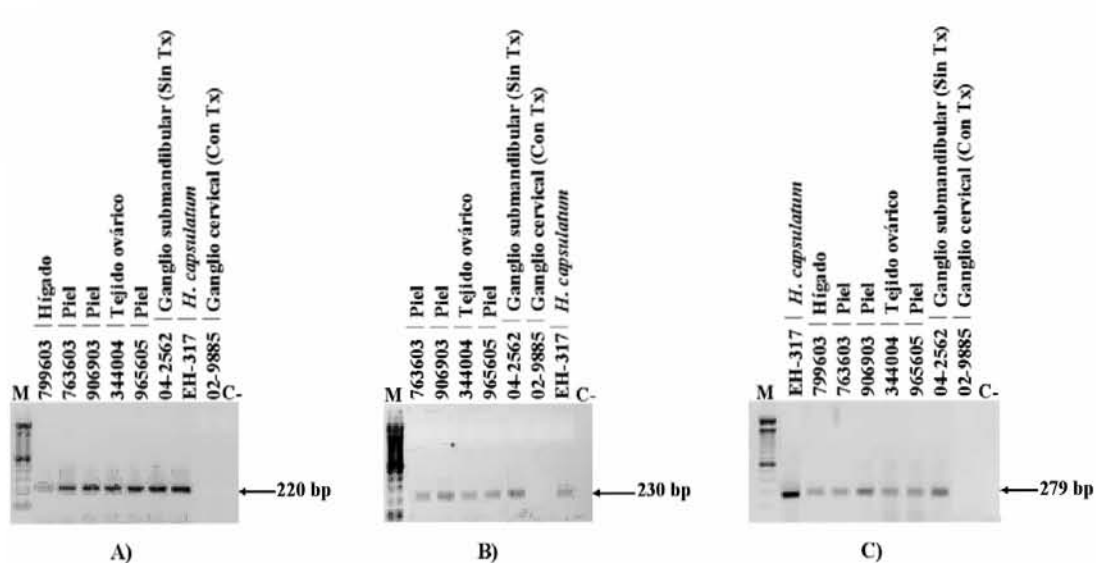
**Figura 18. Especificidad de la sonda del antígeno M.** Se utilizaron DNAs de hongos heterólogos y DNA de tejido de humano aplicando las condiciones establecidas para la PCR con este marcador. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

**Muestras clínicas.** Se analizaron 17 muestras clínicas colectadas de pacientes con cuadro clínico indicativo de histoplasmosis o con histoplasmosis confirmada. Las dos primeras muestras que se analizaron (1261E y 1261B) provenían de un paciente con histoplasmosis confirmada, el DNA de éstas se obtuvo por rompimiento del tejido con perlas de vidrio utilizando el aparato FastPrep, pero la calidad del DNA no fue adecuada, ya que cuando se llevó a cabo la PCR utilizando los dos SCARs, una muestra resultó positiva y la otra negativa con estos marcadores. En el caso del antígeno M ambas muestra resultaron negativas. Por este motivo, se decidió utilizar el DNeasy Tissue kit, con el que se obtuvo DNA de mejor calidad. Con este método de extracción, la PCR resultó adecuada para los marcadores SCARs, pero la sonda del antígeno M no amplificó (Fig. 19).



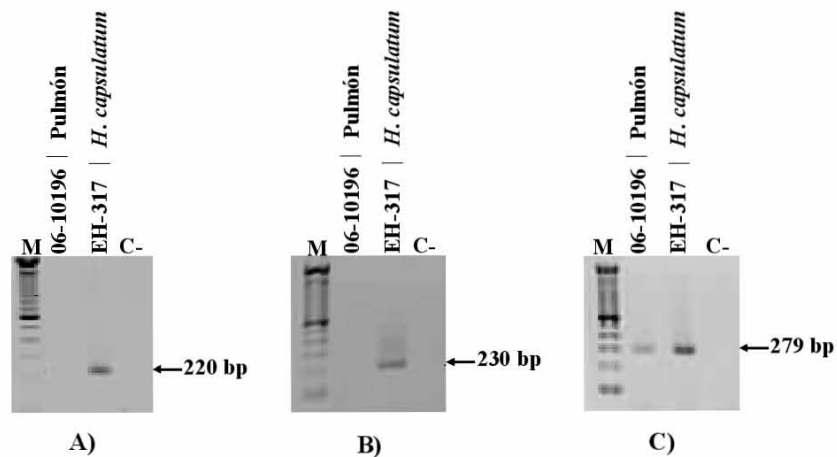
**Figura 19. PCR de muestras de tejido de un paciente con cuadro clínico compatible con la histoplasmosis.** Se utilizaron dos muestras de tejido de un paciente (1261-E y 1261-B) y se amplificaron con los tres marcadores moleculares. A) SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub>, B) SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> y C) sonda del antígeno M, de acuerdo con las condiciones previamente descritas. M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

El DNA de las 15 muestras clínicas restantes (Tabla 5), se obtuvo con el DNeasy Tissue kit, de estas muestras sólo siete resultaron positivas con los tres marcadores moleculares (SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub>, SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> y sonda del antígeno M), observando en cada caso una sola banda del tamaño esperado (220, 230 y 279 bp respectivamente), independientemente del órgano analizado (Fig. 20). Estos resultados concordaron con los hallazgos histopatológicos de los pacientes, ya que en todos los casos positivos se observaron levaduras semejantes a *H. capsulatum*.



**Figura 20. PCR de muestras de tejidos obtenidas de pacientes con cuadro clínico compatible con la histoplasmosis.** La amplificación se llevó a cabo con los tres marcadores moleculares, A) SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc), B) SCAR 1253<sub>230</sub>(Hc) y C) sonda del antígeno, de acuerdo con las condiciones previamente descritas. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

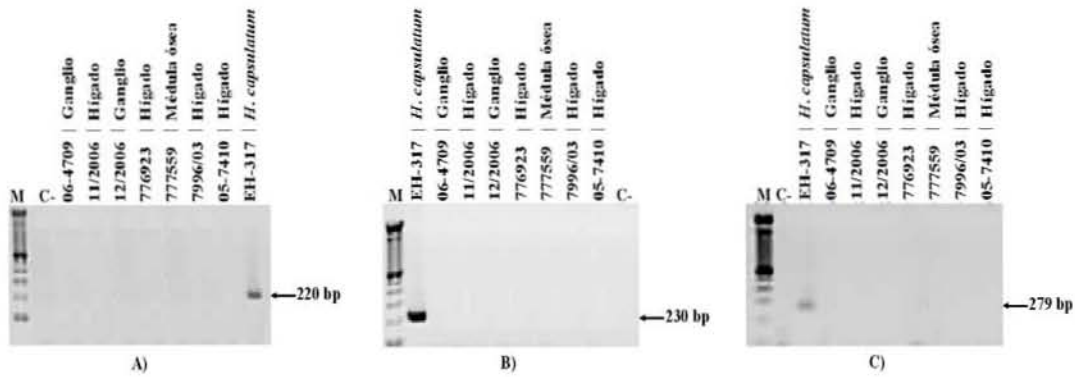
La muestra clínica 06-10196 proveniente de un paciente con sospecha de histoplasmosis y criptococosis, resultó positiva con la sonda del antígeno M, pero negativa para los marcadores SCARs (Fig. 21). Conjuntamente se llevó a cabo la caracterización fenotípica de la muestra, donde se aisló el hongo *C. neoformans*, este hallazgo corrobora la especificidad de los marcadores SCARs.



**Figura 21. Especificidad de los marcadores SCARs y la sonda del antígeno M utilizando muestras clínicas.** Se probó una muestra proveniente de un paciente con criptococosis (06-10196), aplicando las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) Marcador SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub>, B) Marcador SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

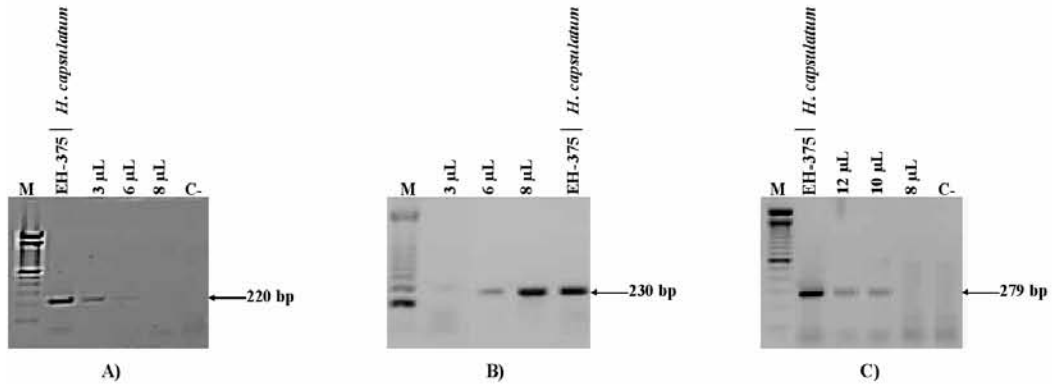
Otra muestra 06-4709 obtenida de un paciente con sospecha de coccidioidomicosis (Tabla 5), resultó negativa con los tres marcadores moleculares, debido a que ninguno de ellos detectó al hongo *C. immitis* (Fig. 22).

Por otro lado, cuando se analizaron cinco muestras procedentes de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis (hígado, ganglio, 05/7410, 776923 y 777559) y con antecedentes de serología negativa para *H. capsulatum*, las PCRs utilizando los tres marcadores resultaron negativas, estos hallazgos moleculares confirman la especificidad de los marcadores. Cuando se analizaron las muestras 7996/03 (Hígado) y 7636/0 (piel) del mismo paciente con antecedentes de histoplasmosis cutánea, la primera resultó negativa y la segunda resultó positiva con los tres marcadores moleculares.



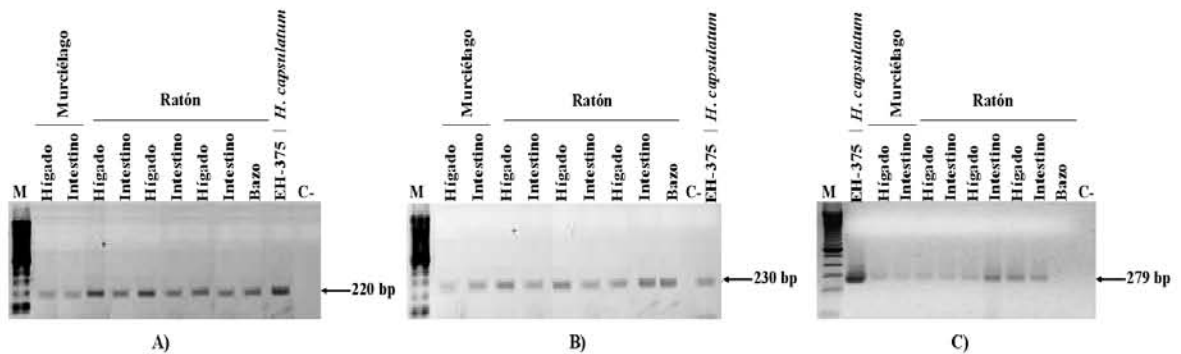
**Figura 22. Especificidad de los marcadores SCARs y la sonda del antígeno M utilizando muestras de pacientes con cuadro clínico compatible con histoplasmosis.** Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) Marcador SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc), B) Marcador SCAR 1253<sub>230</sub>(Hc) y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

**Muestras de ambientes naturales.** La detección de *H. capsulatum* con el DNA extraído de tejidos de animales, natural o experimentalmente infectados con el hongo, se llevó a cabo por PCR, de acuerdo con las condiciones de amplificación anteriormente establecidas. Debido a que la cantidad de DNA extraído con el DNeasy tissue kit fue mínima, no fue posible visualizarla con luz UV. Para obtener una buena amplificación de estas muestras, con los SCARs y sonda del antígeno M (279 bp) fue necesario realizar curvas de concentración de DNA. Se observó que en el caso de los SCARs, el volumen de DNA requerido para revelar la banda de 220 y 230 bp fue entre 3-8  $\mu$ L y para la sonda del antígeno M se necesitaron de 8-12  $\mu$ L de solución de DNA (Fig. 23). Partiendo de los resultados anteriores, los volúmenes de DNA que se utilizaron para los ensayos de PCR a partir de tejidos de ratón y murciélagos infectados con *H. capsulatum*, fueron de 8  $\mu$ L para los SCARs y 12  $\mu$ L para la sonda del antígeno M.



**Figura 23. Curva de concentración de DNA de una muestra de tejido de ratón.** Se utilizaron diferentes volúmenes de DNA obtenido de tejido de un ratón infectado con *H. capsulatum*. Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) Marcador SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> y B) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

La PCR para la identificación de *H. capsulatum* en tejido de animales experimentalmente infectados con el hongo, se logró en todas las muestras analizadas usando los marcadores SCARs, pero en el caso de la sonda del antígeno M dos muestras resultaron negativas (Fig. 24).

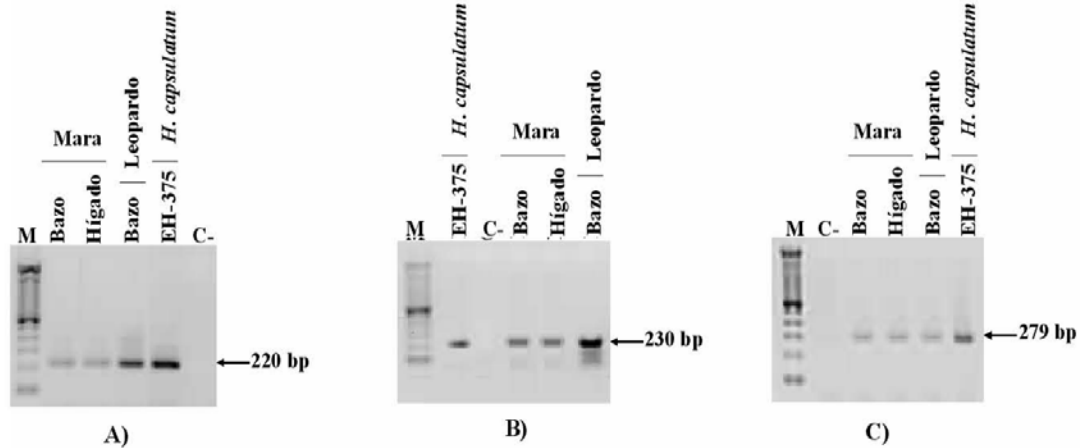


**Figura 24. PCR de muestras de tejido de murciélagos y ratones experimentalmente infectados con *H. capsulatum*.** Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) Marcador SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub>, B) Marcador SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> y C) Sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

Cuando se evaluaron los tres marcadores moleculares con 10 muestras obtenidas de animales infectados dentro de su hábitat natural (mara, leopardo y ualabi),

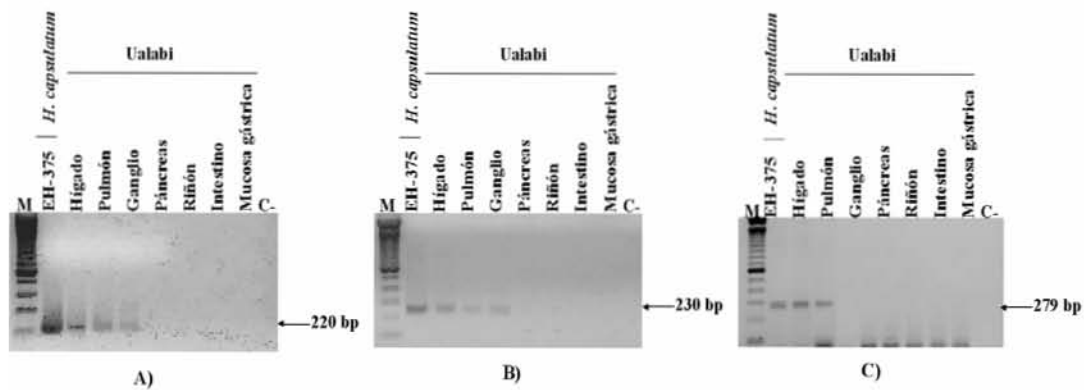


observamos que las muestras de mara y leopardo resultaron positivas en todos los casos. La figura 25 muestra los amplicones de 220, 230 y 279 pb correspondientes a los tres marcadores moleculares estudiados.



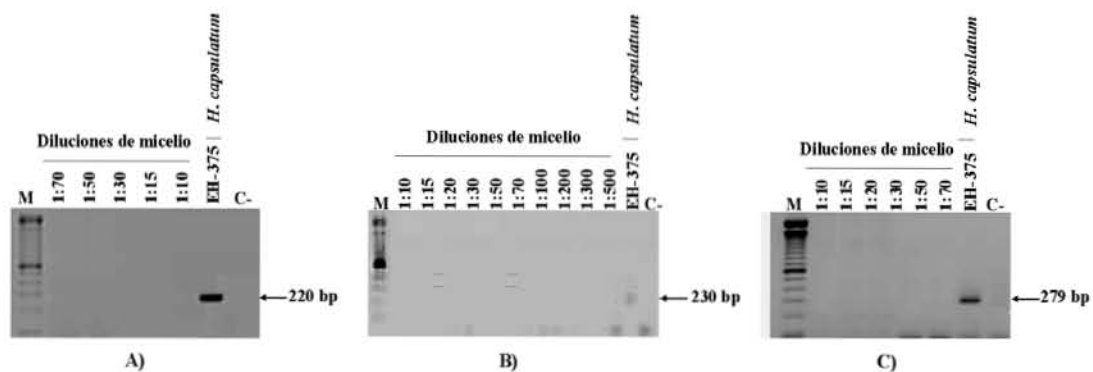
**Figura 25. PCR de muestras de tejido de animales mantenidos en cautiverio e infectados naturalmente con *H. capsulatum*.** Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) Marcador SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc), B) Marcador SCAR 1253<sub>230</sub>(Hc) y C) Sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

En el caso de las siete muestras procedentes del espécimen ualabi (Tabla 4), únicamente dos muestras (hígado y pulmón) resultaron positivas con la sonda del antígeno M y tres muestras (hígado, pulmón y ganglio) fueron positivas con los dos marcadores SCARs, como se observa en la figura 26.



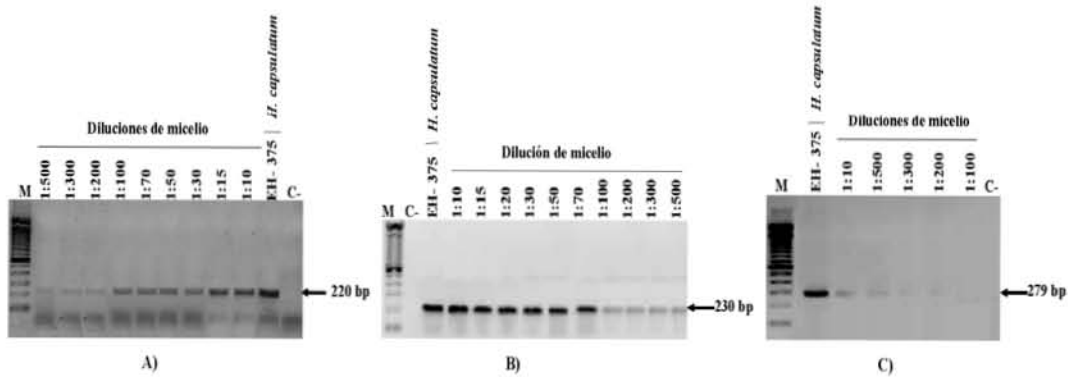
**Figura 26.** PCR de muestras de tejido de ualabi mantenido en cautiverio e infectado naturalmente con *H. capsulatum*. Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) SCAR 1253<sub>220</sub>(H<sub>c</sub>), B) SCAR 1253<sub>230</sub>(H<sub>c</sub>) y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

La detección del DNA de *H. capsulatum* en las muestras de suelo utilizando los SCARs 1253<sub>220</sub>(H<sub>c</sub>), 1253<sub>230</sub>(H<sub>c</sub>) y la sonda del antígeno M, se realizó con las condiciones de reacción previamente descritas para cada marcador molecular. Inicialmente, no se logró la amplificación de los DNAs de suelo, con ninguno de los marcadores estudiados. Estos resultados negativos se generaron por la inhibición de la PCR provocada por la presencia de residuos de arcilla en el DNA (Fig. 27).



**Figura 27.** PCR de DNA extraído de suelo contaminado con *H. capsulatum*. El DNA se extrajo de diferentes diluciones de micelio. Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores. A) SCAR 1253<sub>220</sub>(H<sub>c</sub>), B) SCAR 1253<sub>230</sub>(H<sub>c</sub>) y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

Para descartar la inhibición de la PCR por la presencia de arcilla en la mezcla de reacción, se incluyeron en ésta 3  $\mu\text{L}$  de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) a una concentración de 40ng/ $\mu\text{L}$  (Kreader, 1996). Con la introducción de la BSA, los oligonucleótidos SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub>-F - 1253<sub>220(Hc)</sub>-R y 1253<sub>230(Hc)</sub>-F - 1253<sub>230(Hc)</sub>-R detectaron correctamente al hongo en todas las muestras contaminadas, independientemente del método de extracción empleado (Fig. 28).

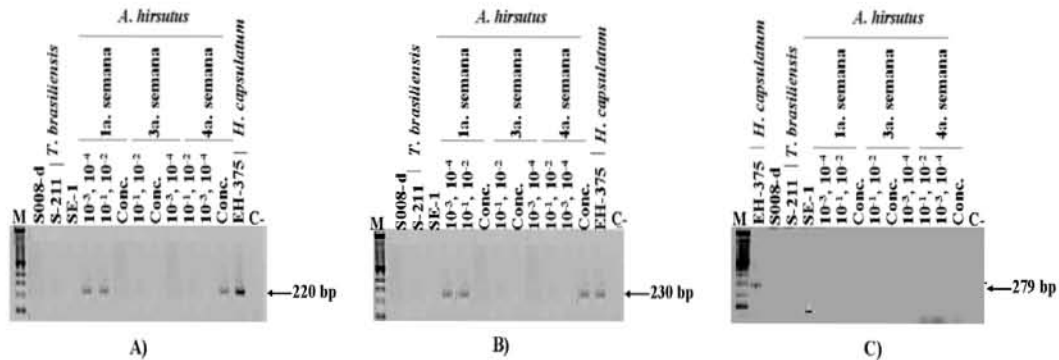


**Figura 28. PCR de DNA extraído de suelo contaminado con *H. capsulatum*, utilizando BSA.** El DNA se extrajo de diferentes diluciones obtenidas a partir de una muestra de suelo contaminada con una concentración conocida de micelio (1 g/mL). El DNA se liberó de la muestra con el equipo FastPrep y se procesó como se menciona en Materiales y Métodos. Se aplicaron las condiciones establecidas para la PCR de estos marcadores, adicionando BSA. A) SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub>, B) SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

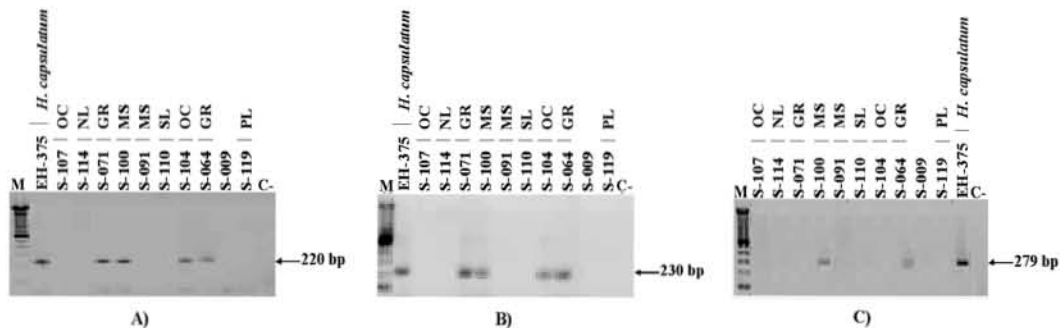
La sonda del antígeno M, sólo amplificó la banda de 279 bp en las muestras contaminadas con mayor concentración de micelio (hasta la dilución 1:200). A pesar de la adición de la BSA en la mezcla de reacción. (Fig. 28). Estos resultados negativos en las diluciones mayores de micelio, nuevamente se pueden atribuir a la poca sensibilidad de la sonda.

De las nueve muestras de guano colectadas de murciélagos en cautiverio (Tabla 7), tres resultaron positivas con los dos marcadores SCARs y ninguna con la sonda del antígeno M (Fig. 29). Por otro lado, de las 12 muestras de suelo colectadas en diferentes zonas endémicas en el país, cuatro fueron positivas con los SCARs mientras que únicamente dos fueron positivas con la sonda del antígeno M (Figs. 29 y 30), esta

diferencia de resultados puede estar relacionada con la sensibilidad de éste marcador y con la cantidad de DNA que contienen las muestras.



**Figura 29. Especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M en muestras de guano de murciélagos.** Se utilizaron muestras de guano de murciélagos infectados experimentalmente con *H. capsulatum* y mantenidos en cautiverio, colectadas a diferentes tiempos (1, 3 y 4 semanas). A) SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc), B) SCAR 1253<sub>230</sub>(Hc) y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.



**Figura 30. Especificidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M en muestras de guano colectadas en zonas endémicas de MX.** Se utilizaron muestras de guano colectadas en Oaxaca (OC), Nuevo León (NL), Guerrero (GR), Morelos (MS), Sinaloa (SL) y Puebla (PL), aplicando las condiciones establecidas para la PCR de cada marcador. A) SCAR 1253<sub>220</sub>(Hc), B) SCAR 1253<sub>230</sub>(Hc) y C) sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

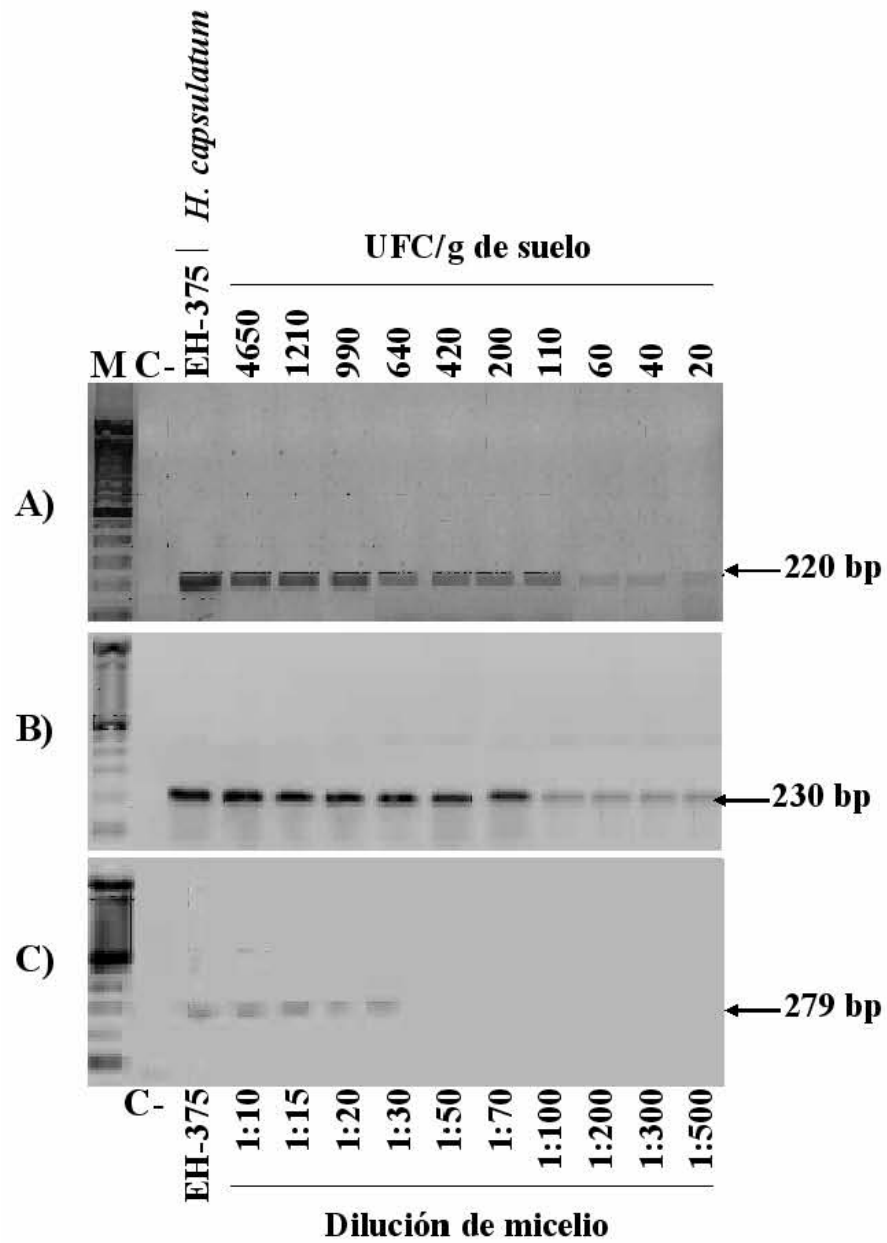
## Cuantificación del número de UFC en muestras de suelo

Para establecer las condiciones apropiadas para la extracción de DNA en muestras de suelo o guano, se utilizaron muestras de suelo, colectadas de jardineras, libres de excreta de aves y murciélagos, que se contaminaron posteriormente con diferentes concentraciones de micelio de *H. capsulatum* (Tabla 6), de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Para asegurarnos que la concentración de partículas fúngicas disminuía conforme se aumentaba la dilución, se leyó la densidad óptica de cada dilución, como se observa en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Curva de concentración de micelio de *H. capsulatum* determinada por densidad óptica

Dilución de micelio	Densidad óptica
Blanco	0.000
1:10	2.960
1:15	1.312
1:20	1.111
1:30	0.851
1:50	0.393
1:70	0.312
1:100	0.206
1:200	0.152
1:300	0.073
1:500	0.063

Con el propósito de determinar el número de microorganismos en muestras de suelo, detectadas por PCR, con los marcadores SCARs y la sonda del antígeno M, se llevó a cabo el conteo por duplicado de las UFC presentes en cada dilución de micelio, se calcularon las UFC/g de suelo y con ello el límite de detección de los marcadores. En la tabla 10 se observa que los dos marcadores SCARs detectaron por PCR al hongo en todas las diluciones realizadas. Además se calculó que había 15 UFC/g de suelo a partir de la relación entre la dilución de micelio (1:500) y el número de UFC. En el caso de la sonda del antígeno M, sólo detectó hasta la dilución 1:30 contaminada con el hongo, que correspondió a 640 UFC/g de suelo (Fig. 31).



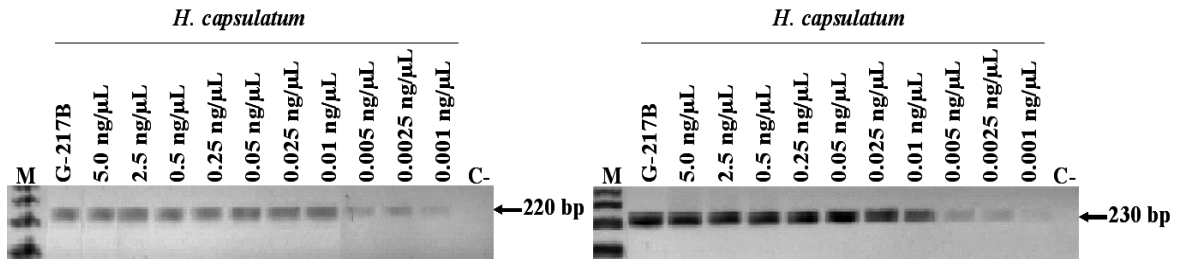
**Figura 31. Correlación entre la PCR de los DNAs obtenidos de las diluciones de micelio y el número de UFC de *H. capsulatum* en muestras de suelo.** Las diluciones de muestras de suelo cuantificadas, se utilizaron para PCR con los marcadores SCARs A) 1253220(Hc) y B) 1253220(Hc) y con C) la sonda del antígeno M. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

**Tabla 10.** Relación entre las diluciones de micelio de *H. capsulatum* y las UFC

Dilución de micelio	Densidad óptica	UFC			
		UFC	UFC	UFC promedio	UFC/g suelo
Blanco	0	0	0	0	0
1:10	2.960	490	450	465	4650
1:15	1.312	130	111	121	1210
1:20	1.111	94	104	99	990
1:30	0.851	76	51	64	640
1:50	0.393	44	39	42	420
1:70	0.312	21	18	20	200
1:100	0.206	9	13	11	110
1:200	0.152	4	7	6	60
1:300	0.073	3	5	4	40
1:500	0.063	0	3	2	20

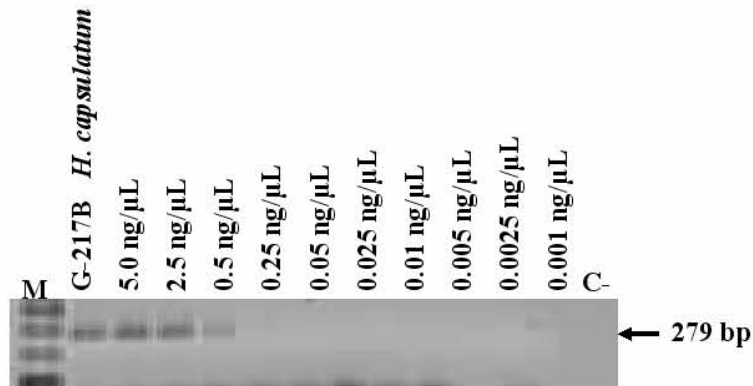
### Análisis de la sensibilidad de los marcadores SCARs y de la sonda del antígeno M

En la figura 32 se observa la amplificación de las diferentes concentraciones de DNA obtenido de una cepa de *H. capsulatum* (G-217B) con los marcadores 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>. Ambos marcadores lograron amplificar hasta 1 pg/μL de DNA del patógeno.



**Figura 32.** Determinación de la sensibilidad de los marcadores SCARs. La PCR se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de DNA obtenido de la cepa G-217B de *H. capsulatum*. (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

La sensibilidad de la sonda del antígeno M se evaluó también a través de la amplificación de diferentes concentraciones de DNA de *H. capsulatum*. A diferencia de los marcadores SCARs, la mínima cantidad de DNA que logró detectar esta sonda fue de 0.5 ng/μL (Fig. 35). El ensayo se realizó por triplicado, y en ninguno de los casos se pudo detectar hasta 1 pg de DNA, como lo refieren sus autores (Matos-Guedes *et al.*, 2003).



**Figura 33. Determinación de la sensibilidad de la sonda del antígeno M.** Se utilizaron concentraciones variables de DNA obtenido de una cepa de *H. capsulatum* (G-217B). (C-) control negativo, M-100 bp DNA Ladder.

## DISCUSIÓN

Hasta el momento, se han desarrollado diversos marcadores moleculares para la identificación de *H. capsulatum* con fines diagnósticos y epidemiológicos. La mayoría de las sondas reportadas en la literatura, se han obtenido a partir de genes ribosomales (Sandhu *et al.*, 1995; Reid y Schafer, 1999; Lindsley *et al.*, 2001; Martagon-Villamil *et al.*, 2003; Buitrago *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006), cuya naturaleza conservada dentro del reino de los hongos puede conducir a resultados inespecíficos con otros aislados fúngicos. Otras de las sondas reportadas en la literatura presentan ciertas inconveniencias como la que se encuentra disponible a nivel comercial (Accuprobe). Recientemente se demostró que ésta también detecta el DNA de *Chrysosporium* (Brandt *et al.*, 2005), por ello, su uso en pruebas diagnósticas es poco confiable. Las sondas diseñadas a partir de genes particulares del patógeno (Bialek *et al.*, 2002; Bracca *et al.*, 2003; Matos-Guedes *et al.*, 2003) son las que más destacan por su aparente



especificidad, pero no han sido ampliamente evaluadas con aislados de diferentes países ni validadas por comparación con otras pruebas para garantizar su uso como prueba diagnóstica. Los ensayos de PCR anidada propuestos por Bialek *et al.* (2002) y Bracca *et al.* (2003) son muy sensibles; sin embargo, este tipo de PCR conlleva diversos problemas, entre ellos la amplificación inespecífica como resultado de la contaminación de los primeros productos de reacción durante su manipulación. Esto ha sido demostrado por Bialek *et al.* (2002), quienes observaron que aun en condiciones astringentes (elevada temperatura de alineamiento) en su PCR anidada no pudieron evitar amplificaciones inespecíficas.

Otras sondas para la identificación de *H. capsulatum* están diseñadas para emplearse en metodologías como PCR-EIA, PCR en tiempo real o Southern blot. Estas sondas han mostrado buenos resultados, pero su utilidad en laboratorios intrahospitalarios se limita debido a su complejidad, elevado costo y falta de protocolos estandarizados para llevarlos a cabo.

No obstante que existen numerosas sondas para la identificación de *H. capsulatum*, se justifica la búsqueda de otros marcadores debido a que los existentes presentan poca sensibilidad o especificidad, escasa reproducibilidad, elevado costo o laboriosidad de las metodologías empleadas, pero quizá la razón más importante es la diversidad genética que existe entre los aislados de *H. capsulatum* (Chávez-Tapia *et al.*, 1998; Reyes-Montes *et al.*, 1998; 1999; Taylor *et al.*, 1997b; 2000a; 2000c; 2002; Pounder *et al.*, 2006. Por esta razón, Frías De León (2004) obtuvo dos marcadores SCARs, el 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, a partir de una banda de 1.2 Kb monomórfica para los aislados de MX, CO, AR, PA, GT y EUA. Para utilizar estos marcadores fue necesario valorar su especificidad y sensibilidad con diferentes muestras y productos biológicos, así como comparar su eficiencia con la sonda del antígeno M, reportada en la literatura (Matos-Guedes *et al.*, 2003). La selección de esta sonda se hizo con base en que los autores reportaron que es altamente sensible (1 pg), no presenta reactividad cruzada con hongos relacionados a *H. capsulatum*, fue diseñada a partir de la secuencia del gen que codifica para el antígeno inmunodominante M del hongo y fue probada con DNAs de aislados procedentes de Sudamérica.

Debido a que los SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> se obtuvieron a partir de un solo marcador de 1.2 Kb generado por RAPD-PCR, este estudio se inició con el alineamiento entre las secuencias de dichos marcadores para descartar homología entre

ellos. El resultado del alineamiento reveló que a pesar de que ambos marcadores provienen de una misma banda obtenida del patrón polimórfico del RAPD-PCR, tienen secuencias totalmente distintas porque no se encontró ninguna región homóloga.

Por otro lado, debido a que la banda de 1.2 Kb forma parte del patrón polimórfico generado de amplificaciones al azar, cabe la posibilidad de que los SCARs que se diseñaron se encuentren en otras regiones diferentes a la de 1.2 Kb, ya que no tenemos la certeza de que la secuencia de esta banda sea única en todos los aislados, debido a que los marcadores obtenidos por RAPD-PCR no son homólogos, por lo que fue necesario llevar a cabo ensayos de hibridación entre los SCARs y los patrones polimórficos RAPD-PCR. Las hibridaciones demostraron que todos los DNAs del patógeno contienen la secuencia de ambos SCARs porque en todos los patrones polimórficos se reveló una señal de hibridación. Además, estos ensayos nos permiten sugerir que se trata de una región única o de una sola copia dentro del genoma de *H. capsulatum*, aunque no sabemos si la banda de 1.2 Kb pertenece a un gen específico del hongo. La localización de la banda se dedujo al observar que las sondas SCARs hibridaron exclusivamente en la región donde se localiza la banda de 1.2 Kb y no forman parte de otras bandas con distinto peso molecular. También estos resultados nos indican que no se trata de secuencias repetitivas, porque a pesar de que el Southern blot se realizó en condiciones de baja astringencia (38 y 39°C) no se observó más que una sola señal de hibridación en el patrón polimórfico del RAPD-PCR.

Cuando se probó la especificidad de los SCARs con aislados de *H. capsulatum* de diferente origen geográfico, los dos marcadores, 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub>, fueron 100% específicos. Al probar la especificidad con aislados heterólogos, el SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> no reconoció a ninguno de los DNAs probados (*P. brasiliensis*, *C. immitis*, *S. schenckii*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. albicans* y humano), en el caso de la sonda de 1253<sub>230(Hc)</sub> que se diseñó a partir de una secuencia que no mostraba homología con ningún otro organismo (Frías De León, 2004), amplificó el material genético de *A. niger* y de humano, cabe destacar que el producto de reacción del DNA humano no correspondió a la banda de 230 bp. Este resultado se puede deber a que no todos los organismos han sido secuenciados al 100% o a que no todas las secuencias se encuentran depositadas en la base de datos, por lo que es posible que se encuentre cierta homología con otro organismo aun cuando el diseño de las sondas se realice cuidadosamente (Brandt *et al.*, 2005). Al probar conjuntamente la especificidad de la

sonda del antígeno M con aislados de *H. capsulatum* de diferente origen geográfico, aplicando las condiciones de amplificación reportadas por los autores (Matos-Guedes *et al.*, 2003), no se obtuvo ninguna amplificación, por lo que fue necesario modificar las condiciones de reacción de la PCR, esto demuestra la escasa reproducibilidad del ensayo. Al contar con las condiciones óptimas de amplificación se observó que esta sonda fue 100% específica para los aislados homólogos, pero inespecífica con aislados heterólogos, ya que amplificó DNA de *C. neoformans* y humano. Es importante destacar que las bandas inespecíficas amplificadas del DNA humano con el SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> no se observaron al analizar las muestras clínicas, por lo que para descartar cualquier homología entre el SCAR y el genoma humano realizamos la comparación de las secuencias respectivas en el GenBank (no se muestran los resultados), encontrando que no existe homología entre ellas, por lo que la amplificación se puede atribuir a una contaminación de la muestra, ya que también la sonda del antígeno M mostró este mismo resultado. Esta homología se descartó cuando se analizaron otras muestras clínicas de pacientes con probable histoplasmosis, donde no se observaron las bandas inespecíficas con DNA humano, por lo que la inespecificidad con el DNA humano no representa impedimento para su uso en la detección del hongo en muestras clínicas.

El SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> detectó eficazmente al hongo en las muestras clínicas y de ambientes naturales. Asimismo el SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> también detectó al patógeno en muestras clínicas y guano, sin embargo la confiabilidad de los resultados en muestras de suelo se dificulta porque este SCAR amplifica la misma banda en DNA de *A. niger* por la homología que presenta con la secuencia de este hongo. Este hecho limita el uso del SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> en muestras de suelo, ya que *A. niger* es ubicuo.

La especificidad de los SCARs, también se reflejó al probar dos muestras de tejido (piel e hígado) de paciente con histoplasmosis cutánea, la muestra de piel fue positiva y la muestra de hígado fue negativa, este resultado es aceptable, puesto que se trataba de una histoplasmosis localizada (piel), sería positiva en ambas muestras si se tratara de una histoplasmosis diseminada. También la sonda del antígeno M reprodujo estos resultados. Es importante destacar que cuando se valoró la especificidad de las muestras clínicas y de ambientes naturales con la sonda del antígeno M se observó que algunas muestras que fueron positivas con los SCARs resultaron negativas con esta sonda, esto se debió a que la cantidad de DNA en esas muestras clínicas fue tan pequeña

que la sonda del antígeno M no logró amplificarlo y al aumentar la concentración de DNA se logró la amplificación de las muestras, estos resultados mostraron la poca sensibilidad de la sonda.

Para probar el nivel de sensibilidad de las tres sondas, se hicieron diluciones de un DNA de *H. capsulatum* y se amplificaron con las tres sondas, los SCARs amplificaron hasta 1 pg de DNA y la sonda del antígeno M sólo detectó hasta 500 pg de DNA del patógeno. Esta observación también se reflejó cuando las tres sondas se utilizaron para amplificar el DNA del hongo en muestras de ambientes naturales. Cuando se utilizaron muestras de suelo contaminadas con diferentes concentraciones de micelio de *H. capsulatum*, los SCARs amplificaron nítidamente la banda de 220 y 230 bp en las diluciones de la muestra que contenían de 4650 a 20 UFC/g de suelo mientras que, la sonda del antígeno M sólo detectó hasta las diluciones de la muestra que contenían de 4650 a 640 UFC/g de suelo. Estos resultados evidencian nuevamente la baja sensibilidad de la sonda del antígeno M, por lo que se restringe el uso de esta sonda a estudios epidemiológicos ya que persiste la posibilidad de encontrar resultados falsos-negativos debido a la baja sensibilidad de la sonda. Esto se observó claramente al amplificar el DNA de guano colectado en zonas endémicas, donde los marcadores SCARs detectaron la presencia en tres muestras pero la sonda del antígeno M sólo detectó al patógeno en dos muestras. Asimismo, cuando se utilizó DNA obtenido de 10 muestras de guano de murciélagos mantenidos en cautiverio e infectados experimentalmente, los SCARs detectaron al hongo en tres muestras y la sonda del antígeno M en ninguna. Este resultado es de gran relevancia, puesto que aunque el hongo se ha aislado del guano de murciélago, no se ha confirmado que el murciélago deyecte al hongo, esta evidencia complementa el hallazgo reportado por Klite y Diercks (1965), donde mencionan que el hongo se encuentra en intestino causando daño. Para corroborar nuestros resultados estas muestras fueron probadas empleando otra sonda para *H. capsulatum* reportada por Bialek *et al.* (2003) mostrando los mismos resultados obtenidos con los SCARs (resultados no mostrados), de esta manera se descartó la duda de una amplificación inespecífica por estos marcadores y corroborándose la baja sensibilidad de la sonda del antígeno M. Sin embargo, para confirmar estos hallazgos se hará un análisis más extenso de los guanos defecados por murciélagos infectados experimentalmente, ya que si realmente el hongo es eliminado por el murciélago

apoyaría la teoría de que éste actúa como reservorio de *H. capsulatum* (Klite y Diercks, 1965).

Estas observaciones apoyan fuertemente el uso de los marcadores SCARs en estudios epidemiológicos, ya que actualmente los procedimientos que se utilizan para el aislamiento e identificación de *H. capsulatum* en muestras ambientales, presentan inconvenientes puesto que es un método indirecto que consiste en la inoculación de ratones con suspensiones de suelo para posteriormente cultivar fragmentos de sus hígados y bazo, además el método es caro y lento ya que requiere alrededor de dos meses para confirmar la presencia de *H. capsulatum* en la muestra (Reid y Schafer, 1999). Otro método que se utiliza para aislar al hongo de muestras de suelo es por dilución de éstas y selección de colonias en placa, pero resulta poco efectivo, ya que en la mayoría de los casos el hongo es inhibido por otros microorganismos presentes en la muestra (Klite y Diercks, 1965). El uso de los marcadores SCARs aumentaría el conocimiento sobre la distribución endémica y epidémica de la histoplasmosis en el país, igualmente definiría no sólo sus formas clínicas en las áreas de más alta prevalencia de la enfermedad, sino también sobre las fuentes de infección de los pacientes con SIDA y la distribución del hongo en el ambiente natural, así como se delimitarían zonas de alto riesgo, ya que en México está bien documentado que las actividades ocupacionales relacionadas a la arqueología, geología, antropología y biología, así como los trabajadores del campo tales como campesinos, peones recolectores de guano y especialmente mineros, espeleólogos y excursionistas que frecuentan minas, cuevas y recintos abandonados donde se encuentra el hongo en su fase infectiva (Taylor *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2000c; Taylor *et al.*, 1997a; Taylor *et al.*, 200b). Además la detección de *H. capsulatum* directamente en suelo permitiría la apropiada aplicación de desinfectantes efectivos o evitaría la remoción de suelos contaminados evitando que se cierren o clausuren áreas contaminadas con el hongo.

Con base en los resultados obtenidos, creemos que el SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> es un candidato idóneo hasta ahora para la identificación del hongo *H. capsulatum* en muestras clínicas, ya que es necesario emplear métodos que permitan investigar rápidamente la presencia del hongo, no obstante que las pruebas serológicas son muy útiles para el diagnóstico en pacientes con infección moderada a grave, los anticuerpos requieren cuando menos 15-20 días para ser detectables después de la exposición inicial

al patógeno. La utilidad de estas pruebas varía con el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad (Wheat, 2003). Por otro lado, la detección de antígeno en diferentes fluidos biológicos, es el método de inmunodiagnóstico más rápido en los casos de histoplasmosis diseminada; sin embargo, se puede presentar cruce reactivo con antígenos similares de otros hongos como *P. brasiliensis*, *P. marneffe* y *B. dermatitidis* (Wheat *et al.*, 1997). Para cubrir las limitaciones de los métodos tradicionales, sería de gran ayuda emplear los marcadores SCARs como pruebas confirmatorias para detectar e identificar *H. capsulatum*, sobretodo en pacientes con inmunosupresión por varias causas, incluyendo el SIDA.

## CONCLUSIONES

1. El marcador SCAR 1253<sub>220(Hc)</sub> es una herramienta útil para la detección de *H. capsulatum* a nivel diagnóstico y epidemiológico.
2. El uso del SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> a nivel epidemiológico es limitada debido a la homología con el hongo *A. niger*.
3. Los marcadores SCARs son más sensibles que la sonda del antígeno M.
4. La utilidad diagnóstica de la sonda del antígeno M es limitada debido principalmente a la baja sensibilidad y a la homología que presenta con el DNA de *C. neoformans*.
5. Las secuencias del SCAR 1253<sub>230(Hc)</sub> y de la sonda del antígeno M no son homólogas con el genoma humano.
6. Los marcadores SCARs 1253<sub>220(Hc)</sub> y 1253<sub>230(Hc)</sub> son secuencias de una sola copia dentro del genoma de *H. capsulatum*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi PA**, Miller SA, Meulia T, Hoiting HA, Kim J. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5421-5426.
- Altschul SF**, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Bialek R**, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 40:1642-1647.
- Bracca A**, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. 2003. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 41:1753-1755.
- Brandt ME**, Gaunt D, Iqbal N, McClinton S, Hambleton S, Sigler L. 2005. False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe chemiluminescent test result caused by a *Chryso sporium* species. *J. Clin. Microbiol.* 43:1456-1458.
- Buitrago MJ**, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez T, Cuenca-Estrella M. 2007. Assesment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis. *Enferm Infecc Microbio Clín.* 25:16-22.
- Castrillo LA**, Vandenberg JD, Wraight SP. 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *J. Invertebr. Pathol.* 82:75-83.
- Chávez-Tapia CB**, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Flores-Estrada JJ, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1998. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. *Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Méx.* 11:187-191.
- Chemaly RF**, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, Procop GW. 2001. Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using AccuProbe on an excised valve. *J. Clin. Microbiol.* 39:2640-2641.



- Frías De León MG.** 2004. Generación de oligonucleótidos específicos de *Histoplasma capsulatum* usando marcadores RAPD. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 65 pp.
- Gómez B,** Figueroa J, Hamilton A, Ortiz B. 1997. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:2618-2622.
- Hall GS,** Pratt-Rippin K, Washington JA. 1992. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30:3003-3004.
- Huffnagle K,** and Gander R. 1993. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* Accuprobes. *J. Clin. Microbiol.* 31:419-421.
- Kasuga T,** Taylor JW, White TJ. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J. Clin. Microbiol.* 37:653-663.
- Kasuga T,** White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, De Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Kamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* 12:3383-3401.
- Keath EJ,** Kobayashi GS, Medoff G. 1992. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphism in a nuclear gene. *J. Clin. Microbiol.* 30:2104-2107.
- Keath EJ,** Spitzer ED, Painter AA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2369-2372.
- Kersulyte D,** Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 174:7075-7079.
- Klite PD,** Diercks FH. 1965. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the Canal Zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14:433-439.
- Kreader CA.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumine or T4 gene 32 protein. *Applied Environmental Microbiology.* 62:1102-1106.
- Lamps LW,** Molina CP, West AB, Haggitt RC, Scott MA. 2000. The pathologic spectrum of gastrointestinal and hepatic histoplasmosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 113:64-72.
- Li KN,** Rouse DI, Eyestone EJ, German TL. 1999. The generation of specific DNA

primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*: Mycol. Res. 11:1361-1368.

**Lindsley MD**, Hurst SF, Nauren JI, Morrison CJ. 2001. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J. Clin. Microbiol. 39:3505-3511.

**Martagon-Villamil J**, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 41:1295-1298.

**Matos-Guedes HL**, Jefferson Guimaraes A, Medeiros Muniz M, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, Deepe GS Jr, Zancopé-Oliveira RM. 2003. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. J. Clin. Microbiol. 41:535-539.

**Morgan J**, Cano M, Feikin D, Phelan M, Velásquez MO, Carpenter J, Weltman A, Spitzer PG, Liu HH, Mirza SA, Bronstein DE, Morgan DJ, Kirkman LA, Brandt ME, Iqbal N, Lindsley MD, Warnock DW, Hajjeh RA. 2003. A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, México, Spring 2001. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69:663-669.

**Padhye A**, Smith G, Standard P, McLaughlin D, Kaufman L. 1994. Comparative evaluation of chemiluminiscent DNA Probe Assays and Exoantigen Test for Rapid identification of *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis*. J. Clin. Microbiol. 32:867-870.

**Pedroza-Serés M**, Quiroz-Mercado H, Granados J, Taylor ML. 1994. The syndrome of presumed ocular histoplasmosis in Mexico: A preliminary study. J. Med. Vet. Mycol. 32:83-92.

**Pounder JI**, Hansen D, Woods GL. 2006. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides* species by Repetitive-Sequence-Based PCR. J. Clin. Microbiol. 44:2977-2982.

**Reid TM**, Schafer MP. 1999. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. Mol. Cell. Probes. 13:269-273.

**Reyes-Montes MR**, Bobadilla-del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Flores-Robles E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1998. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Méx. 11:195-201.

- Reyes-Montes MR**, Bobadilla del Valle M, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Maravilla E, Sifuentes-Osornio J, Taylor ML. 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J. Clin. Microbiol.* 37:1404-1408.
- Sandhu GS**, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 33:2913-2919.
- Schlech WF**, Wheat LJ, Ho JL. 1983. Recurrent Urban Histoplasmosis, Indianapolis, Indiana, 1980-1981. *Am. J. Epidemiol.* 118:301-312.
- Spitzer ED**, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. 1989. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 57:1409-1412.
- Stockman L**, Clark KA, Hunt JM, Roberts G. 1993. 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.* 31:845-850.
- Tang YW**, Li H, Durkin MM, Sefers SE, Meng S, Connolly PA, Stratton Ch, Wheat LJ. 2006. Urine polymerase chain reaction is not as sensitive as urine antigen for the diagnosis of disseminated histoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53:46-51.
- Taylor ML**, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fung. Genet. Biol.* 30:207-212.
- Taylor ML**, Granados J, Toriello C. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses.* 39:375-37.
- Taylor ML**, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montaña-Ortiz G, Pedroza-Serés M. 2000b. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. *Gac. Méd. Méx.* 136:441-448.
- Taylor ML**, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. 1997a. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia.* 138:137-141.
- Taylor ML**, Reyes-Montes MR. Nuevas aportaciones sobre la epidemiología de la histoplasmosis en México: avances en el conocimiento de aspectos inmunológicos y moleculares y de la distribución geográfica del agente etiológico. *VITAE Academia Biomédica Digital.* 10:1-3, 1-4, 1, 1-2, 2002.

<http://caibco.ucv.ve/vitae/VitaeDiez/Articulos/Micologia/Histoplasmosis/ArchivosHTML/Antecedentes.htm>

**Taylor ML**, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. 2000c. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in México. *In*: Benedik M. (ed.). Research Advances in Microbiology. Global Research Network. Kerala. 29-35.

**Taylor ML**, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ. 1997b. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo*. 23:58-63.

**Taylor ML**, Rodríguez-Arellanes G, Reyes-Montes MR, Romero-Martínez R. 2006. *Histoplasma capsulatum* y la epidemiología de la histoplasmosis, capítulo 35, p. 201-209 *In*: Méndez-Tovar, L.J; López-Martínez, R. y Hernández-Hernández, F. (eds.). Actualidades en Micología Médica, Contenido Temático del VI Diplomado en Micología Médica Dr. Ernesto Macotela Ruiz. 3ª ed. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F., ISBN: 970-32-3620-0.

**Taylor ML**, Ruiz-Palacios GM, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Carreto-Binaghi LE, Duarte-Escalante E, Hernández-Ramírez A, Pérez A, Suárez-Álvarez RO, Roldán-Aragón YA, Romero-Martínez M, Sahaza-Cardona JH, Sifuentes-Osornio J, Soto-Ramírez LE, Peña-Sandoval GR. 2005b. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, México. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45:435-441.

**Taylor ML**, Toriello C, Pérez-Mejía A, Martínez MA, Reyes-Montes MR, Espinosa-Ávila L, Chávez-Tapia C. 1994. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological approach. *Rev. Mex. Mic.* 10:49-62.

**Tewari R**, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of histoplasmosis, p. 373-407. *In*: Ajello L, Hay RJ (eds.). *Medical Mycology*. Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections, 9º ed. Arnold and Oxford University Press, Inc. New York, N.Y.

**Ueda Y**, Sano A, Tamura M, Inomata T, Kamei K, Yokoyama K, Kishi F, Ito J, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K. 2003. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. *Vet. Microbiol.* 94:219-224.

**Vaca-Marín MA**, Martínez-Rivera MA, Flores-Estrada JJ. 1998. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. *Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Méx.* 11:208-215.

- Velasco-Castrejón O.** 1998. Micosis Profundas, p.231-243. *En:* García-García ML, Giono-Cerezo S, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino-Gómez JL (eds.). Infecciones Respiratorias Agudas y Crónicas. IN-DRE, Secretaria de Salud. México, D. F.
- Wheat LJ.** 2003. Current diagnosis of histoplasmosis. *Trends in Microbiol.* 11:488-494.
- Wheat LJ, Slama TG, Eitzen HE, Kohler RB, French ML, Biesecker JL.** 1981. A large urban outbreak of histoplasmosis: clinical features. *Annals of Internal Medicine.* 94:331-337.
- Wheat LJ, Kohler R and Tewari R.** 1986. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N. Engl. J. Med.* 314:83-88.
- Wheat LJ.** 1994. Histoplasmosis recognition and treatment. *Clin. Infect. Dis.* 19:19-27.
- Wheat LJ, Wheat H, Connolly P, Kleiman M, Supparatpinyo KS, Nelson K, Restrepo A.** 1997. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin. Infect. Dis.* 24:1169–1171.
- Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E and Connolly P.** 2002. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43:29-37.
- Weber J, Díez J, Selosse M, Tagu D, Le Tacon F.** 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations: Mycorrhiza. 12:19-27.
- Williams B, Fojtasek M, Connolly-Stringfield P, Wheat LJ.** 1994. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118:1205-1208.
- Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE.** 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction based epidemiological and clinical studies. *J. Clin. Microbiol.* 31:463-464.
- Xu M, Huaracha E, Korban SS.** 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome.* 44:63-70.
- Xu M and Korban SS.** 2003. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in apple genome. *Plant Mol. Biol.* 50:803-818.