



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**CO-INFECCIÓN DE *Histoplasma
capsulatum* y *Pneumocystis* spp. EN
MURCIÉLAGOS SILVESTRES EN
LATINOAMÉRICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**Candidato a Doctor
ANTONIO ERNESTO GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. MARIA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA
DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO**

MÉXICO, D.F.

Junio, 2012



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **GONZÁLEZ GONZÁLEZ ANTONIO ERNESTO** con número de cuenta 86226006, con la tesis titulada "**CO-INFECCIÓN DE *Histoplasma capsulatum* y *Pneumocystis spp.* EN MURCIÉLAGOS SILVESTRES EN LATINOAMÉRICA.**" realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO:**

Presidente: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
Vocal: DR. EVERARDO CURIEL QUESADA
Secretario: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES
Suplente: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de junio de 2012

M: del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme terminar satisfactoriamente en tiempo y forma el Doctorado en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con referencia 23492 (número de becario 49009) durante los semestres 2009-1 al 2012-2, para la realización de mis estudios de Doctorado.

A SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS-NORD M05-A03 y DGAPA-PAPIIT-IN203407-3, UNAM, por el financiamiento a mi proyecto de Doctorado.

A los miembros del Comité Tutorial, Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello, Dra. Concepción Toriello Nájera y Dr. Joaquín Cifuentes Blanco por sus valiosas aportaciones al proyecto y por el tiempo que dedicaron para analizar y aportar una crítica constructiva a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

A los miembros del jurado para el examen de grado:

Presidente: Dr. Julio Granados Arriola

Vocal: Dr. Everardo Curiel Quesada

Secretario: Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Suplente: Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes

Suplente: Dra. Concepción Toriello Nájera

Al Dr. Eduardo Dei-Cas, jefe del Laboratorio de Biología y Diversidad de Patógenos Eucariotes Emergentes (BDEEP) del Instituto Pasteur de Lille y al Dr. El Moukhtar Aliouat, jefe del Departamento de Parasitología-Micología, Facultad de Ciencias Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad de Lille-Nord, Lille, Francia, por permitirme realizar diferentes ensayos para este proyecto en sus instalaciones durante mi estancia en sus respectivas instituciones.

A mi Tutoral Principal y jefa del Laboratorio de Inmunología de Hongos de la Facultad de Medicina, UNAM, Dra. Maria Lucia Taylor da Cunha e Mello, por su paciencia, por todo el tiempo dedicado para la escritura de los artículos, revisión de presentaciones, revisión de conceptos y una lista interminable de discusiones sobre aspectos académicos que fueron importantes para mí formación, gracias por compartir sus conocimientos conmigo y creer en mí.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis compañeros del laboratorio Tania, Jorge, Raúl, Toño Ramírez, Gaby, Dany y Eugenia por su ayuda y compañía en las arduas horas de trabajo, por hacer de mi estancia en el laboratorio algo ameno, gracias.

A todo el equipo de trabajo Francés por el apoyo prestado durante mi estancia y de manera especial a El Moukhtar Aliouat por su paciencia y orientación.

DEDICATORIAS

A mi madre, porque con este trabajo se cierra un ciclo del cual formaste parte, gracias por tu apoyo.

A mi hija Lilide porque tú eres el presente y el futuro, no desperdices tú infancia y juventud en odios y rencores, siempre lucha por las causas justas sin importar donde sean.

A Angélica.

A mis hermanos.

A todos los que no están ya entre nosotros pero viven en mi corazón.

ÍNDICE	
RESUMEN	pag 1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> (<i>H. capsulatum</i>)	3
Ciclo de vida de <i>H. capsulatum</i>	3
Histoplasmosis	5
Procedimientos diagnósticos de la histoplasmosis	6
Marcadores moleculares utilizados para detectar la presencia de <i>H. capsulatum</i> en tejidos del huésped	7
Importancia biológica de la proteína codificada por el gen <i>Hcp100</i> de <i>H. capsulatum</i>	8
Importancia biológica del antígeno M de <i>H. capsulatum</i>	9
<i>Pneumocystis</i> spp.	9
Aspectos relevantes para la clasificación del género <i>Pneumocystis</i>	9
Ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> spp.	11
Especies del género <i>Pneumocystis</i>	12
Neumocistosis	13
Procedimientos diagnósticos de la neumocistosis	13
Marcadores moleculares utilizados para detectar la presencia de <i>Pneumocystis</i> spp. en tejidos del huésped	13
Co-infección con ambos parásitos: hallazgos preliminares	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16

OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS	
Muestras de murciélagos	17
Extracción de DNA	17
Detección molecular de <i>H. capsulatum</i> por PCR	18
Detección molecular de la presencia de <i>H. capsulatum</i> por PCR-anidada del marcador <i>Hcp100</i>	18
Determinación de la diseminación de <i>H. capsulatum</i> utilizando el marcador <i>Hcp100</i>	19
Detección molecular de la presencia de <i>H. capsulatum</i> por PCR convencional para el marcador del antígeno M	20
Detección molecular de <i>Pneumocystis</i> sp. por PCR	20
Detección molecular de la presencia de <i>Pneumocystis</i> sp. por PCR-anidada del marcador <i>mtLSUrRNA</i>	20
Detección molecular de la presencia de <i>Pneumocystis</i> sp. por PCR-anidada del marcador <i>mtSSUrRNA</i>	21
Visualización de los amplicones	22
Obtención de las secuencias	22
Análisis de secuencias por BLASTn y BLASTx	22
Criterio de inclusión para considerar los murciélagos infectados con cada patógeno	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Detección molecular de la presencia de <i>H. capsulatum</i> en pulmón de murciélagos con el marcador <i>Hcp100</i>	25
Datos totales para los tres países de Latinoamérica	25
Datos totales por país	
Argentina	26
Guyana Francesa	27
México	28

Determinación de la especificidad del marcador <i>Hcp100</i> utilizando DNA de hongos heterólogos y de tejidos de otros mamíferos	30
Determinación de la diseminación de <i>H. capsulatum</i> utilizando el marcador <i>Hcp100</i>	32
Detección molecular de la presencia de <i>H. capsulatum</i> en pulmón de murciélagos con el marcador del antígeno M	32
Datos totales para los tres países de Latinoamérica	33
Detección molecular de la presencia de <i>Pneumocystis</i> sp. en pulmón de murciélagos con los marcadores <i>mtLSUrRNA</i> y <i>mtSSUrRNA</i>	34
Datos totales para los tres países de Latinoamérica	34
Datos totales por país	34
Argentina	34
Guyana Francesa	36
México	36
Detección molecular de la co-infección de <i>H. capsulatum</i> y <i>Pneumocystis</i> sp. en pulmón de murciélagos	38
Datos totales por país	38
Argentina	38
Guyana Francesa	39
México	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVA	50
BIBLIOGRAFÍA	51
Anexo 1. Lista de muestras con secuencias no publicadas del marcador <i>Hcp100</i> y depositadas en el GenBank, obtenidas de pulmón de murciélagos infectados con <i>H. capsulatum</i>	67

Anexo 2. Lista de muestras con secuencias no publicadas del marcador <i>Hcp100</i> y depositadas en el GenBank, obtenidas de bazo de murciélagos infectados con <i>H. capsulatum</i>	68
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>H. capsulatum</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> spp.	12
Figura 3. Representación porcentual de las especies de murciélagos estudiados	24
Figura 4. Gel de agarosa de la amplificación del marcador <i>Hcp100</i>, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de Argentina	26
Figura 5. Gel de agarosa de la amplificación del marcador <i>Hcp100</i>, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de Guyana Francesa	27
Figura 6. Gel de agarosa de la amplificación del marcador <i>Hcp100</i>, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de México	29
Figura 7. Gel de agarosa de la amplificación del marcador <i>Hcp100</i>, en muestras de DNAs heterólogos	30
Figura 8. Alineamiento de las secuencias del marcador <i>Hcp100</i> de <i>H. capsulatum</i> con las secuencias de <i>B. dermatitidis</i>	31
Figura 9. Gel de agarosa de la amplificación del marcador del antígeno M, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de México	33
Figura 10. Alineamiento de las secuencias del fragmento del gen del antígeno M de <i>H. capsulatum</i>	34
Figura 11. Gel de agarosa de la amplificación del marcador <i>mtLSUrRNA</i> de <i>Pneumocystis</i> sp., en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de Argentina	35
Figura 12. Gel de agarosa de la amplificación del marcador <i>mtSSUrRNA</i>, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de México	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especie, número y procedencia geográfica de los murciélagos estudiados	18
--	-----------

Tabla 2. Especies y familias de los murciélagos utilizados	24
Tabla 3. Hábitos conductuales y patrón de distribución geográfica de las especies capturadas	25
Tabla 4. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Argentina, detectados con el marcador <i>Hcp100</i>	27
Tabla 5. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Guyana Francesa, detectados con el marcador <i>Hcp100</i>	28
Tabla 6. Datos de infección de los murciélagos procedentes de México, detectados con el marcador <i>Hcp100</i>	29
Tabla 7. Datos de diseminación de <i>H. capsulatum</i> a bazo de murciélagos, detectados con el marcador <i>Hcp100</i>	32
Tabla 8. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Argentina, detectados con los marcadores <i>mtLSUrRNA</i> y <i>mtSSUrRNA</i>	36
Tabla 9. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Guyana Francesa, detectados con los marcadores <i>mtLSUrRNA</i> y <i>mtSSUrRNA</i>	36
Tabla 10. Datos de infección de los murciélagos procedentes de México, detectados con los marcadores <i>mtLSUrRNA</i> y <i>mtSSUrRNA</i>	38
Tabla 11. Datos de co-infección de los murciélagos procedentes de Argentina	39
Tabla 12. Datos de co-infección de los murciélagos procedentes de Guyana Francesa	39
Tabla 13. Datos de co-infección de los murciélagos procedentes de México	40

RESUMEN

Histoplasma capsulatum y *Pneumocystis* spp. causan infección en el huésped afectando primariamente pulmón. *H. capsulatum* es endémico en los Estados Unidos y en muchos países de Latinoamérica. Los murciélagos tienen una asociación especial con el patógeno *H. capsulatum* en ambientes que contienen guano acumulado. La característica huésped-específica de *Pneumocystis* sp. ha sido principalmente determinada fenotípicamente y genotípicamente en animales de laboratorio. La caracterización de este microorganismo alojado en animales silvestres, especialmente en murciélagos, permanece como una interrogante para entender la diseminación de este patógeno en la naturaleza. Para evaluar el impacto de las infecciones por *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. en la naturaleza se monitorearon muestras de tejido obtenidas de murciélagos capturados al azar, usando técnicas moleculares. Veintiún murciélagos de Argentina (AR), trece de Guyana Francesa (GF) y 88 de México (MX), fueron muestreados utilizando PCR-anidada del locus *Hcp100* para *H. capsulatum* y de los loci *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA* para *Pneumocystis* spp. De los 122 murciélagos estudiados, 98 (80.3%) (95% IC= 83.7-73.3%) y 52 (42.6%) (95% IC= 51.2-34%) revelaron infecciones por *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp., respectivamente. En relación con las tasas de infección de los murciélagos, utilizando el marcador *Hcp100*, resalta: 90.4% (95% IC = 95.4-85.4%) para murciélagos de AR; 30.7% (95% IC = 54.2-7.2%) para murciélagos de GF; y 85.2% (95% IC = 92.4-78%) para murciélagos de MX. La tasa de diseminación de *H. capsulatum* a bazo fue de 76.5% (95% IC = 85.7-67.3%), referida únicamente para murciélagos de MX y AR, y sólo para siete de las nueve especies estudiadas. La detección molecular de la presencia de *H. capsulatum* en los murciélagos estudiados, usando el marcador del antígeno M no reveló datos confiables debido a la menor sensibilidad de éste con respecto al marcador *Hcp100*, así como a la gran dificultad para secuenciar su producto amplificado. En relación con las tasas de infección de los murciélagos, utilizando los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*, destaca: 38% (95% IC = 58.5-17.5%) para murciélagos de AR; 46.1% (95% IC = 73.1-19.1%) para murciélagos de GF; y 46.5% (95% IC = 56.8-36.2%) para murciélagos de MX. Finalmente, 50 murciélagos (ocho de AR, cuatro de GF y 38 de MX) presentaron co-infección con ambos hongos, lo que corresponde a una tasa total de co-infección de 40.9% (95% IC= 49.5-32.3%), destacando para cada país, 38% (95% IC = 58.5-17.5%) para murciélagos de AR, 30.7% (95% IC = 33.8-27.6%) para murciélagos de GF y 43.1% (95% IC = 53.2-33%) para murciélagos de MX. En el presente estudio, se ha reportado altas tasas de infección de murciélagos con *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp., involucrando a estos mamíferos como reservorio y dispersor de cada parásito, destacando la co-infección de murciélagos con ambos microorganismos.

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum and *Pneumocystis* spp. cause host infection primarily affecting lung tissue. *H. capsulatum* is endemic in the United States and many Latin American countries. Bats have a special association with the pathogen *H. capsulatum* in environments containing accumulated guano. *Pneumocystis*-host specificity has been mainly determined either pheno- or genotypically in laboratory animals. Characterization of this microorganism harbored by wild animals, especially in bats, remains as an important issue to understand dissemination of this pathogen in nature. To evaluate the impact of *H. capsulatum* and *Pneumocystis* sp. infections in nature, tissue samples obtained from randomly captured bats were monitored, using molecular techniques. Twenty-one bats from Argentina (AR), 13 from French Guyana (FG), and 88 from Mexico (MX), were screened using nested-PCR of the fragments, *Hcp100* locus for *H. capsulatum* and *mtLSUrRNA* and *mtSSUrRNA* loci for *Pneumocystis* spp. From these 122 studied bats, 98 (80.3%) (95% CI= 83.7-73.3%) and 52 (42.6%) (95% CI= 51.2-34%) revealed *H. capsulatum* and *Pneumocystis* sp. infections, respectively. Regarding bat infection rates, using the *Hcp100* marker, stands out: 90.4% (95% CI = 95.4-85.4%) for bats from AR; 30.7% (95% CI = 54.2-7.2%) from FG; and 85.2% (95% CI = 92.4-78%) from MX. The rate of *H. capsulatum* dissemination to spleen was 76.5% (95% CI = 85.7-67.3%), referring only to bats from MX and AR, and only for seven out of nine bat species studied. Molecular detection of the presence of *H. capsulatum* in the studied bats, using the M antigen marker, did not reveal reliable data due to its lesser sensitivity than that of *Hcp100* marker and the great difficulty to sequence its amplified product. In regard to bat infection rates, using the *mtLSUrRNA* and *mtSSUrRNA* markers, stands out: 38% (95% CI = 58.5-17.5%) for bats from AR; 46.1% (95% CI = 73.1-19.1%) from FG; and 46.5% (95% CI = 56.8-36.2%) from MX. Finally, 50 bats (eight from AR, four from FG, and 38 from MX) presented co-infection with both fungi, which corresponds to a total co-infection rate of 40.9% (95% CI= 49.5-32.3%); highlighting for each country, 38% (95% CI = 58.5-17.5%) for bats from AR, 30.7% (95% CI = 33.8-27.6%) from FG, and 43.1% (95% CI = 53.2-33%) from MX. In the present study high rates of bat infection with *H. capsulatum* and *Pneumocystis* sp. were found, involving this mammal as reservoir and disperser of each parasite, emphasizing the co-infection of bats with both microorganisms.

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* (*H. capsulatum*)

El hongo *H. capsulatum* se sitúa en el reino Fungi, phylum Ascomycota, clase Eurotiomycetes, subclase Eurotiomycetidae, orden Onygenales, familia Onygenaceae y/o Ajellomycetaceae (Hibbett et al., 2007; Index Fungorum, 2008; James et al., 2006).

Tradicionalmente, la especie *Histoplasma capsulatum* comprende tres variedades taxonómicas [*H. capsulatum* var. *capsulatum* - Darling, 1906, *H. capsulatum* var. *duboisii* (Vanbreuseghem, 1957) - Ciferri, 1960 y *H. capsulatum* var. *farcimosum* (Rivolta, 1873) - Weeks, Padhye, et Ajello, 1985] identificadas por su micromorfología, distribución geográfica, especificidad para el huésped y cuadro clínico (Tewari et al., 1998).

Actualmente, de acuerdo con una clasificación molecular propuesta por Kasuga et al. (1999; 2003) las variedades taxonómicas están distribuidas en ocho clados o poblaciones genéticas, de los cuales siete son considerados especies filogenéticas, según los estudios filogeográficos del hongo realizados con base en el polimorfismo de la secuencia de fragmentos parciales de cuatro genes codificantes para proteínas: el factor de ribosilación de ADP (*ARF*), el precursor del antígeno H (*H-ANTI*), la desaturasa delta-9 de ácidos grasos (*OLE1*) y la alfa-tubulina (*TUB1*). Cuatro de los clados se encuentran en las Américas y los restantes están referidos en otros continentes. Este mismo estudio, sugiere que la dispersión de *H. capsulatum* en el mundo comenzó hace 3 a 13 millones de años en Latinoamérica (Kasuga et al., 2003).

Este hongo es considerado un complejo de especies crípticas (Taylor et al., 1999b) y puede agrupar aislados y/o cepas con diferencias biológicas en aspectos morfológicos y fisiológicos, serotipos, quimiotipos y virulencia (Domer, 1971; Domer et al., 1967; Gorocica et al., 2009; Kauffman y Blumer, 1966; Taylor et al., 2012b; Tewari y Berkhout, 1972).

Ciclo de vida de *H. capsulatum*

En la naturaleza *H. capsulatum* se desarrolla en suelos con alto contenido de nitrógeno y fósforo, asociado generalmente a la acumulación de guano de murciélagos y aves. Este hongo es haploide estrechamente relacionado a otros hongos dimórficos que también causan micosis respiratorias y sistémicas (Kwon-Chung y Bennett, 1992; Tewari et al., 1998; Woods, 2002).

Es un hongo saprobio-geofílico que crece a 18-28 °C bajo una forma filamentosa multicelular infectiva conocida como fase micelial (M); presenta crecimiento lento y desarrolla colonias

albinas tipo A o pardas tipo B (del inglés brown). A la observación microscópica, se caracteriza por poseer hifas septadas de 1.2-1.5 μm de diámetro con dos tipos de conidios solitarios (aleuroconidios): microconidios o microaleuroconidios redondos, piriformes o en forma de clavos de 1-4 x 2-6 μm y macroconidios o macroaleuroconidios de paredes gruesas, por lo general redondos de 8-14 μm de diámetro, y en la mayoría de los casos con proyecciones digitiformes típicas de la especie (macroconidios tuberculados). El hongo crece intracelularmente en la forma parasitaria y virulenta denominada fase levaduriforme (L) en macrófagos, polimorfonucleares y células dendríticas, así como en células epiteliales y endoteliales de huéspedes mamíferos susceptibles. Asimismo, la fase L se obtiene en cultivo a 37 °C en medios sintéticos adicionados de glucosa y cisteína. Las colonias de fase L tienen un aspecto cremoso de color beige claro u oscuro y presentan superficie rugosa (colonias R) o lisa (colonias S). La micromorfología de las levaduras está representada por células ovaladas uninucleadas, por lo general unigemantes, que varían de 1.3-2 x 2-6 μm de diámetro (Tewari et al., 1998).

Histoplasma capsulatum es un organismo eucariote heterotálico cuya forma asexual o anamorfa tiene los tipos haploides de compatibilidad sexual (a/+) y (α /-). El estado de diploidía se presenta temporalmente en la forma sexual o teleomorfa que resulta del apareamiento de sus tipos (a/+) y (α /-), y que después de dos reducciones meióticas forma ascosporas haploides y constituye una especie única, el ascomiceto *Ajellomyces capsulatus* (Tewari et al., 1998).

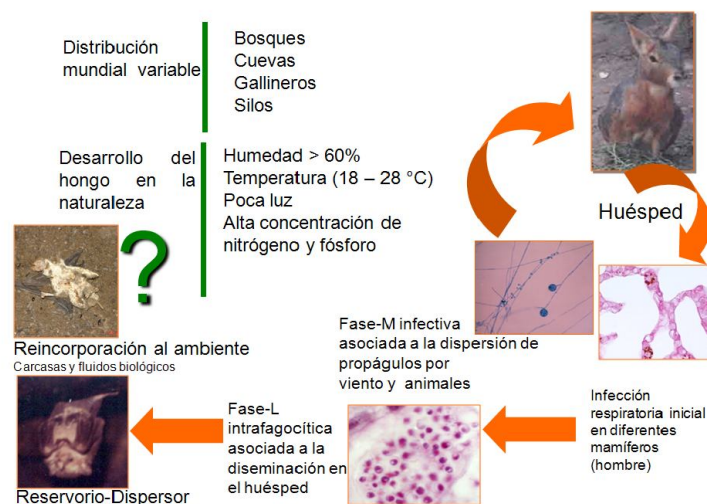


Figura 1. Ciclo de vida de *H. capsulatum*. El esquema muestra los dos morfotipos de *H. capsulatum*, fase micelial (M) y fase levaduriforme (L), así como las condiciones ambientales, físicas y químicas asociadas al desarrollo de cada morfotipo.

Histoplasmosis

La histoplasmosis, anteriormente denominada histoplasmosis americana, es una micosis sistémica que en la mayoría de los casos se desarrolla con compromiso primario pulmonar. Es causada por el patógeno dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* –Darling, 1906, el cual es considerado un parásito intracelular facultativo del sistema fagocítico mononuclear. Es la micosis sistémica de mayor impacto en el continente americano.

La infección con *H. capsulatum* se lleva a cabo cuando propágulos infectivos (microconidios o pequeños fragmentos hifales) aerosolizados son inhalados y se convierten a levaduras en los pulmones del huésped (Kwon-Chung y Bennett, 1992; Tewari et al., 1998; Woods, 2002). El establecimiento y progresión de la infección conlleva a la enfermedad que puede cursar en forma aguda o crónica (forma granulomatosa), con cuadros clínicos que evolucionan de una forma benigna a severa, dependiendo del estado inmune del huésped. En ocasiones, la reactivación de infecciones anteriores se presenta en individuos con inmunosupresión por distintas causas (Wheat, 1995).

Las principales zonas endémicas de la enfermedad se encuentran entre los valles de los ríos Mississippi y Ohio en los Estados Unidos y las áreas de mayor frecuencia de brotes epidémicos se encuentran en los países latinoamericanos (Taylor et al., 1996; 2000b). La enfermedad ha sido descrita originalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, entre los paralelos 45° N y 35° S (Kwon-Chung y Bennett, 1992); sin embargo, un nuevo registro de un brote autóctono en la latitud 54° N en Alberta, Canadá (Anderson et al., 2006), sugiere una mayor dispersión del patógeno en la naturaleza. Esto indica que la distribución geográfica de *H. capsulatum* ha sido ampliada y que posiblemente está relacionada al mayor alcance en la migración de mamíferos y de aves que actúan como dispersores del hongo. En particular, destacan los murciélagos, mamíferos voladores que además de dispersores pueden servir como reservorios del patógeno, lo que implica una aclimatación tanto del dispersor como del hongo en nichos ecológicos localizados en áreas geográficas alejadas de los trópicos.

En México, la histoplasmosis es la micosis sistémica de más alta prevalencia tanto en su forma endémica como epidémica. Esta última ha sido registrada en todas las entidades federativas y representa un problema de salud ambiental y ocupacional, especialmente para las personas que viven, acuden o trabajan en las zonas consideradas de alto riesgo de infección, donde se encuentran las condiciones que conforman el nicho ecológico del agente etiológico (Taylor et al., 2000b; 2012c; Velasco-Castrejón, 1998). En las zonas endémicas de

México, la respuesta cutánea al antígeno crudo (histoplasmina) está estrechamente relacionada con ciertas actividades laborales (Taylor et al., 1996; 2000b). Los más altos porcentajes de pruebas positivas se asocian con individuos que trabajan como limpiadores de bocaminas, mineros, guías turísticos de cuevas o grutas, recolectores de guano e individuos que manejan pollinaza o gallinaza (excretas de aves utilizadas como complemento alimentario para ganado). Por las actividades ocupacionales referidas se puede explicar, en parte, la más alta respuesta de la población masculina a la reacción intradérmica con la histoplasmina. Es importante considerar la posible participación de factores hormonales asociados a la susceptibilidad de la infección por *H. capsulatum* y, en la histoplasmosis experimental, se ha comprobado que los ratones machos son más susceptibles a la infección que las hembras (Taylor et al., 1982).

La gran mayoría de los pacientes expuestos a *H. capsulatum* (> 99%) son asintomáticos o desarrollan únicamente una sintomatología leve que no es exclusiva de la histoplasmosis (Kauffman, 2007).

La histoplasmosis pulmonar aguda puede afectar individuos cuyas actividades laborales o recreacionales los exponen a altas concentraciones de propágulos infectivos del hongo (Colombo et al., 2011; Kwon-Chung y Bennett, 1992; Taylor et al., 2000b; Tewari et al., 1998). Mientras que la histoplasmosis diseminada usualmente ocurre en huéspedes inmunocomprometidos, como lo serían individuos con: infección por HIV, trasplantes de órganos, tratamiento con corticoesteroides o antagonistas del factor de necrosis tumoral, así como deficiencia congénita de células T (Kauffman, 2007). Los síntomas de la histoplasmosis diseminada son fiebre, malestar, anorexia y pérdida de peso y puede además involucrar distintos sistemas y/u órganos, como lo son el sistema reticuloendotelial, piel, tracto gastrointestinal, intestino, glándulas adrenales, y sistema nervioso central y otros (Kauffman, 2007).

Procedimientos diagnósticos de la histoplasmosis

El diagnóstico de la histoplasmosis se realiza con base en la combinación de los hallazgos de la evaluación clínica cuidadosa y de los resultados de diversas pruebas de laboratorio y de gabinete. Entre las pruebas diagnósticas se incluyen: el examen directo de tejidos y fluidos corporales con diferentes tinciones que permiten la observación microscópica del agente etiológico; el aislamiento de éste en cultivo; la detección de anticuerpos específicos y de antígenos circulantes propios del microorganismo (Muñoz et al., 2010).

Recientemente, se han introducido en el diagnóstico de la histoplasmosis técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y sus variantes, que no sólo ha sido utilizada en el diagnóstico a partir de diferentes muestras clínicas, sino que también ha servido para una rápida identificación del agente etiológico aislado en cultivos (Taylor et al., 2005) y como apoyo a la epidemiología de la enfermedad, al evidenciar la presencia del hongo en tejidos infectados de animales silvestres o en fuentes de infección ambientales (Espinosa-Avilés et al., 2008; Frías De León et al., 2012; González-González et al., 2011; 2012a; Reyes-Montes et al., 2009). No obstante, el éxito de cada prueba varía con la forma clínica de la enfermedad, la severidad de la misma y el uso de marcadores apropiados (Frías De León et al., 2012; De Lima et al., 2012; Muñoz et al., 2010; Reyes-Montes et al., 2009).

Marcadores moleculares utilizados para detectar la presencia de *H. capsulatum* en tejidos del huésped

El uso de marcadores moleculares específicos para determinar la presencia de algún parásito en el huésped ha sido incorporado en los últimos años con relativo éxito en el diagnóstico molecular. Entre los marcadores que han sido más utilizados para *H. capsulatum* destacan dos fragmentos génicos: el del gen *Hcp100* (Bialek et al., 2002) que codifica para una proteína coactivadora y el del gen que codifica para el antígeno M (Guedes et al., 2003; Zancopé-Oliveira et al., 1999) que tiene actividad de catalasa. Estos marcadores son empleados en muestras clínicas con resultados alentadores y algunos controversiales.

Entre estos marcadores sobresale el *Hcp100* debido a su alta especificidad y sensibilidad, lo cual ha sido confirmado por varios grupos de investigación que han validado su uso como herramienta para el diagnóstico clínico molecular de la histoplasmosis (Bialek et al., 2002; Maubon et al., 2007; Muñoz et al., 2010; Toranzo et al., 2009). Asimismo, por su excelente resultado para revelar la presencia de *H. capsulatum* en tejidos de animales que viven en ambientes naturales (Espinosa-Avilés et al., 2008; González-González et al., 2011; 2012a; Reyes-Montes et al., 2009) así como en guano de murciélagos y aves (Estrada-Bárceñas, 2010).

Por otro lado, la secuencia del gen del antígeno M ha permitido el diseño de oligonucleótidos con el fin de desarrollar un ensayo de PCR para la identificación de aislados típicos y atípicos de *H. capsulatum* (Guedes et al., 2003), referido como sensible y específico. Sin embargo, datos recientes publicados por Frías De León et al. (2012) refieren que un par de iniciadores del antígeno M amplificó por PCR una muestra clínica de un paciente con diagnóstico presuntivo de criptococosis y, asimismo, Ibarra-Camou et al. (2011) reportaron que el DNA

de *Emmonsia crescens* amplificó la banda de 279 pb característica del marcador del antígeno M.

Importancia biológica de la proteína codificada por el gen *Hcp100* de *H. capsulatum*

Una revisión actualizada, sobre la actividad biológica y peculiaridades de la estructura del producto del gen *Hcp100*, viene descrita en el trabajo de González-González et al. (2012b). La proteína codificada por el gen *Hcp100* se sobreexpresa desde los 15 min hasta 1 h de contacto entre las levaduras de *H. capsulatum* y macrófagos murinos, en ensayos *in vitro* (Colonna-Romano et al., 1998). El análisis por “Hydrophobic Cluster Analysis” de la estructura de esta proteína demostró que pertenece a la familia de las proteínas de 100 kDa y tiene una similitud de 30-33% con las secuencias de las proteínas coactivadoras de 100 kDa de humano y *Caenorhabditis elegans*, así como con la proteína de 105 kDa de rata (Porta et al., 1999).

La familia de proteínas de 100 kDa es multifuncional y esto se debe principalmente a su compleja estructura de dominios. La proteína de 100 kDa de *H. capsulatum* así como la de diversos organismos de distintos phyla, comprende una estructura conservada con cuatro dominios en tandem denominados “staphylococcal nuclease” (SN) seguidos por un dominio denominado tudor y un quinto dominio SN en el carboxilo terminal. A esta proteína le han sido asignadas diversas funciones, ya que los primeros cuatro dominios SN interactúan con componentes de la maquinaria basal de la transcripción, como lo son factores de transcripción para aumentar su actividad. A las moléculas de este tipo se les denomina proteínas coactivadoras de la transcripción.

Los dominios tudor han sido encontrados en proteínas importantes para el desarrollo de la célula, siendo que muchas de estas proteínas han mostrado estar involucradas en la unión, metabolismo y transporte del RNA (Callebaut y Mornon, 1997; Pontig, 1997). El dominio tudor y el quinto dominio SN interactúan con componentes importantes del RNA “splicing” entre los cuales se incluyen componentes proteicos de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP por sus siglas en inglés) y la proteína nuclear SKIP (Sündstrom et al., 2009).

Los dominios tudor muestran un alto grado de divergencia entre organismos de distintas especies (comparten menos del 20% de identidad) y se caracterizan por tener un segmento más conservado de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos y, dentro de este segmento, se encuentran aminoácidos que son invariables. El dominio tudor de la *Hcp100* comparte

32.4, 32.4 y 25.1% de identidad con los dominios tudor de humano, rata y *C. elegans*, respectivamente, manteniendo sus características funcionales (Porta et al., 1999).

Importancia biológica del antígeno M de *H. capsulatum*

Los principales exoantígenos de *H. capsulatum* son los antígenos H y M que se presentan en ambos morfotipos del hongo. El antígeno H sólo demuestra infección activa mientras que el antígeno M puede ser detectado en infección pasada o presente. Ambos exoantígenos han sido utilizados en el inmunodiagnóstico, particularmente en las pruebas de inmunodifusión en gel para detección de precipitinas, al formar bandas visibles con sus anticuerpos específicos (precipitinas). La precipitina para el antígeno M puede ser estimulada por la administración intradérmica del filtrado soluble del cultivo de *H. capsulatum* conocido como histoplasmina (Deepe, 1994; Deepe y Durose, 1995; Guimaraes et al., 2006). El antígeno M tiene actividad de catalasa, y ha sido caracterizado como una catalasa B (Hamilton et al., 1990; Johnson et al., 2002; Zancopé-Oliveira et al., 1999). El antígeno M tiene epítopes específicos de este hongo, así como epítopes comunes compartidos con otras catalasas de diferentes orígenes (Guimaraes et al., 2008).

***Pneumocystis* spp.**

Este organismo fue descubierto por Carlos Chagas (1909) quien erróneamente lo identificó como un estado esquizonte de protozooario y propuso un nuevo género de tripanosoma llamado *Schizotrypanum* (Chagas, 1909). Este organismo fue redescrito por Antonio Carini un año después (Carini, 1910). Delanoë y Delanoë (1912), en el Instituto Pasteur de Paris, describieron al organismo encontrado como una nueva entidad biológica y especularon su potencial relación con los protozoarios coccidios. Delanoë y Delanoë (1912) sugirieron llamarlo *Pneumocystis carinii*: “Pneumo-“ considerando su tropismo a pulmón, “cystis” por su forma característica y “carinii” en honor a Antonio Carini. Su naturaleza fúngica es aceptada, aunque son incapaces de crecer *in vitro* en medios de cultivos fúngicos y carecen de ergosterol en su membrana plasmática (Ito et al., 2000; Powles et al., 1998; Utili et al., 2007).

Aspectos relevantes para la clasificación del género *Pneumocystis*

La primera especie descrita, *P. carinii*, fue colocada inicialmente en el reino protista, pero actualmente, las especies del género *Pneumocystis* son consideradas como un hongo parásito oportunista de mamíferos, con una alta especificidad hacia el huésped (estenoxenismo).

El género *Pneumocystis* se encuentra asignado al grupo de los hongos con base en varios aspectos fundamentales, entre ellos:

1) El RNA ribosomal (rRNA) tipo 16S de *P. carinii* presenta una gran similitud con su homólogo en las levaduras del phylum Ascomycota (Edman et al., 1988; Stringer et al., 1989). La secuencia del gen que codifica para la subunidad grande del rRNA mitocondrial (*mtLSUrRNA*) (Sinclair et al., 1991) además de otras siete secuencias de genes mitocondriales continuos (Pixley et al., 1991), muestran una alta homología con las secuencias correspondientes de DNA fúngicos. De igual forma, se han descrito genes de *Pneumocystis* que codifican para proteínas que son muy similares a sus homólogos fúngicos, entre las cuales se incluyen la beta-tubulina (Edlind et al., 1992), el factor de transcripción IID y una ATPasa translocadora de cationes tipo-P (Meade y Stringer, 1991).

2) Los genes de dos importantes enzimas, timidilato sintasa (TS por sus siglas en inglés) que cataliza la conversión de desoxiuridilato (abreviado dUMP) a timidilato (abreviado TMP) y dihidrofolato reductasa (DHFR por sus siglas en inglés) que cataliza la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato, se encuentran en *Pneumocystis* localizados en diferentes cromosomas (Edman et al., 1989a; 1989b), como en los organismos no-protozoarios (con excepción de las plantas).

3) La síntesis de proteínas en células eucarióticas requiere de dos moléculas solubles o factores de elongación (EF-1 y EF-2, por sus siglas en inglés) para el ciclo de elongación de las proteínas. Sin embargo, en varios géneros de hongos la síntesis de proteínas requiere de tres factores de elongación (EF-1, EF-2 y EF-3). Similarmente, un gen que codifica una molécula que muestra similitud de estructura con EF-3 de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*, fue detectado en *Pneumocystis* (Ypma-Wong et al., 1992).

4) Los análisis realizados en el marco del “Proyecto Genoma de *Pneumocystis*” mostraron que la mayoría de los transcritos de *P. carinii* tuvieron homología con genes fúngicos (68%), específicamente con los de las levaduras *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, así como con los hongos filamentosos *Aspergillus* spp. y *Neurospora crassa* (Cushion y Smulian, 2006).

5) Algunos aspectos biológicos y estructurales de *Pneumocystis* son compartidos con los hongos. *P. carinii* y *Sch. pombe* tienen un ciclo de vida similar como lo refiere Sugiyama et al. (2006). Además, *Pneumocystis* posee quitina así como beta-glucanos en la estructura de su

pared celular, como la mayoría de los hongos. Aunque no son susceptibles a la mayoría de los antifúngicos, si son inhibidos por las equinocandinas cuyo blanco es la beta-glucano sintasa, enzima que participa en la síntesis del beta-glucano de la pared celular fúngica (Ito et al., 2000; Powles et al., 1998; Utili et al., 2007).

El género *Pneumocystis* según la propuesta de Nishida y Sugiyama (1993) fue inicialmente localizado en el phylum Ascomycota, clase Archiascomycetes, orden Pneumocystidales, familia Pneumocystidaceae, género *Pneumocystis*. Específicamente, el género *Pneumocystis* fue incluido en Taphrynomycotina por Eriksson y Winka (1997). En clasificaciones recientes, con base en el análisis filogenético de las secuencias de seis marcadores génicos (18S, 28S, ITS-por su siglas en inglés- corresponde a la región espaciadora transcrita interna, EF1-alfa, dos fracciones de la RNA polimerasa II, RPB1 (RNA polymerase II subunit B1, por sus siglas en inglés) y RPB2 (RNA polymerase II subunit B2, por sus siglas en inglés), *Pneumocystis* está clasificado en el subphylum Taphrinomycotina, clase Pneumocystidomycetes, orden Pneumocystidales, género *Pneumocystis*, P. Delanoë y Delanoë 1912 (Hibbett et al., 2007; James et al., 2006). Los Archiascomycetes son considerados el más antiguo de los tres linajes evolutivos de Ascomycota (Nishida y Sugiyama, 1993). Las especies de *Pneumocystis* son consideradas como hongos atípicos (Cailliez et al., 1996).

Ciclo de vida de *Pneumocystis* spp.

Todos los estadios del ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. han sido encontrados en pulmones de huéspedes infectados. Con base en los datos obtenidos por microscopía electrónica de transmisión, se sabe que el ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. involucra una forma presumiblemente vegetativa mononuclear de pared delgada conocida como trofozoito. El trofozoito es pequeño (1-5 μm), esférico u oval en formas jóvenes y pleomórfico en las maduras.

La transición de la forma trófica al quiste maduro ocurre a través de tres estadios esporocíticos consecutivos, los cuales son: 1) un esporozoito primario mononuclear de 4-7 μm de diámetro, esferoide con una pared celular electrodensa delgada similar a la de las formas tróficas. El complejo sinaptonemal fue observado por Matsumoto y Yoshida (1984), lo que indica que en este estadio ocurre la división meiótica y, por lo tanto, el ciclo sexual; 2) un estadio de esporozoito multinuclear (de dos a ocho núcleos) con una pared celular gruesa que comprende dos capas de manera similar a las encontradas en la forma quística, una interior electrotranslúcida y una exterior electrodensa hallada en los otros estadios del ciclo de vida;

3) el esporozoito tardío con ocho núcleos y pared gruesa que contiene esporas reconocibles y que no se encuentran completamente delimitadas. La formación de esporas resulta de invaginaciones de la membrana celular del estadio de esporozoito tardío. Cada spora mononuclear presenta una única mitocondria, así como retículo endoplásmico rugoso y liso bien desarrollado, y una pared celular de una sola capa electrodensa, la cual es delineada por una membrana celular que se parece a las de los procariotes Gram-negativos y a las cianobacterias (Barton y Campbell, 1967; Campbell, 1972; Haque et al., 1987; Palluault et al., 1992; Vavra y Kucera, 1970). El quiste por su parte es de mayor tamaño y mide 5-8 μm de diámetro, en general es redondeado con pared gruesa y contiene ocho cuerpos intraquísticos o esporozoitos.

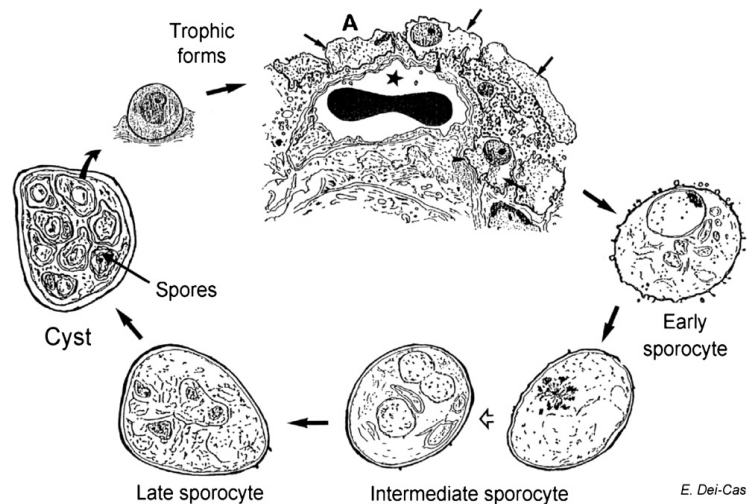


Figura 2. Ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. Esquema con los diferentes estadios del ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. como han sido observados en el huésped infectado. Imagen tomada de Aliouat-Denis et al. (2008).

Especies del género *Pneumocystis*

A la fecha han sido descritas cinco especies para el género *Pneumocystis*: *P. carinii* (Frenkel, 1999), y *P. wakefieldiae* (Cushion et al., 2004) para ratas; *P. jirovecii* (Frenkel, 1999) de humano; *P. murina* (Keely et al., 2004) de ratón y *P. oryctolagy* (Dei-Cas et al., 2006) de conejo. Estas especies muestran divergencia en la secuencia de varios genes, así como marcadas diferencias en la morfología ultraestructural, relación forma quística a trófica, localización en el alveolo pulmonar, tiempo de duplicación *in vivo*, especificidad por el huésped y patología.

La alta especificidad de *Pneumocystis* spp. con su huésped es el resultado de una larga interacción huésped-parásito y una co-evolución y co-especiación, lo cual ha sido explorado comparando al huésped mamífero y la filogenia del parásito (Demanche et al., 2001; Guillot et al., 2001; Hugot et al., 2003). Estos estudios mostraron que los árboles filogenéticos del parásito se asocian a la filogenia del huésped (co-filogenia) (Guillot et al., 2001). La co-filogenia podría ser un patrón dominante de evolución de las especies de *Pneumocystis*, las cuales se han alojado en los pulmones de mamíferos a lo largo de millones de años (Demanche et al., 2001; Guillot et al., 2001; Hugot et al., 2003; Keely et al., 2003; 2004).

Neumocistosis

La infección por *Pneumocystis* puede resultar fatal en individuos inmunocomprometidos. Entre 1981 y 1989, un 60-80% de los pacientes con SIDA presentaban neumocistosis, sin embargo, el diagnóstico oportuno y el tratamiento específico contra el VIH logró disminuir esta incidencia (Dei-Cas et al., 2010). La infección ocurre cuando los trofozoitos o quistes son inhalados y descienden por el tracto respiratorio hasta alcanzar los alvéolos, donde se adhieren a las células de revestimiento alveolar (neumocitos tipo I) y se multiplican. Al parecer el trofozoito entra en contacto con el citoplasma de la célula, sin causar destrucción de ésta. La infección conduce a la disfunción de las células de revestimiento alveolar y, finalmente del alvéolo, causando dificultades respiratorias.

Procedimientos diagnósticos de la neumocistosis

El diagnóstico clínico de la neumocistosis se realiza con base en la demostración de la presencia del patógeno a través de la observación al microscopio utilizando diversos métodos de tinción, así como de inmunofluorescencia con anticuerpos mono y policlonales. La desventaja de los métodos convencionales es que son menos sensibles que los moleculares. Por tal motivo, se ha implementado diversas modalidades de PCR, diseñando marcadores específicos para el diagnóstico oportuno de la neumocistosis.

Marcadores moleculares utilizados para detectar la presencia de *Pneumocystis* spp. en tejidos del huésped

Los marcadores moleculares que se han utilizado para determinar la presencia de *Pneumocystis* spp. en tejidos de huéspedes son los fragmentos génicos de: la región ITS (Lu et al., 1995); la glicoproteína principal de superficie (MSG por sus siglas en inglés) (Gupta et al., 2007; Huang et al., 1999); DHFR (Tamburrini et al., 1998); TS (Olsson et al., 1996); la subunidad *mtLSUrRNA* (Wakefield, 1996; Wakefield et al., 1990) y de la subunidad pequeña del rRNA mitocondrial (*mtSSUrRNA*) (Tsolaki et al., 1998).

Entre estos marcadores moleculares destaca *mtLSUrRNA* debido a que el estudio realizado por Tamburrini et al. (1998) sostiene que este marcador fue más sensible que el 5S del gen del rRNA citoplásmico y el DHFR. En otro estudio el *mtLSUrRNA* fue más sensible que los ITS para detectar *P. jirovecii* (Totet et al., 2003; Tsolaki et al., 1999).

Indudablemente, las secuencias de los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA* han sido de gran utilidad para identificar y separar a las distintas especies de *Pneumocystis* según sus huéspedes y para análisis de filogenia.

Co-infección con ambos parásitos: hallazgos preliminares

La co-infección con varios parásitos de diferentes especies en un huésped susceptible es bien aceptada aunque poco referida. Resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación utilizando marcadores específicos tanto para *H. capsulatum* (*Hcp100*) como *Pneumocystis* spp. (*mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*) detectaron la presencia de ambos patógenos en tejido de pulmón de un mismo murciélago silvestre, lo que demuestra la posible co-infección de *H. capsulatum* y *Pneumocystis* spp. en murciélagos naturalmente infectados. Aunque este tipo de interacción ha sido poco estudiada, su importancia no es lo suficientemente valorada en los sistemas vivos, principalmente de organismos silvestres, donde la co-infección es un evento que se presenta con relativa frecuencia. Estas interacciones entre patógenos en un mismo huésped deben ser mejor evaluadas debido a sus implicaciones nosológicas, epidemiológicas y, asimismo, ecológicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las neumonitis debidas a *H. capsulatum* (histoplasmosis) y a *Pneumocystis* spp. (neumocistosis) son enfermedades fúngicas que se desarrollan en huéspedes susceptibles cuando se encuentran expuestos, en condiciones de riesgo, a estos patógenos. Tanto la histoplasmosis como la neumocistosis se presentan en una amplia variedad de mamíferos, aunque la neumocistosis presenta una característica particular de estenoxenismo (especie específico).

Los murciélagos poseen un alto riesgo de infectarse con *H. capsulatum* en ambientes cerrados con elevadas concentraciones de propágulos infectivos, como cavernas, minas y casas abandonadas (Chávez-Tapia et al., 1998; Taylor et al., 1999a; Tewari et al., 1998). Asimismo, los murciélagos también pueden infectarse con *Pneumocystis* spp. y desarrollar de manera conjunta ambas infecciones.

En este caso, la co-infección con *H. capsulatum* y *Pneumocystis* spp. en murciélagos silvestres ha sido poco explorada, hecho que tiene que ser reconsiderado, tomando en cuenta que ambos patógenos comparten el mismo huésped, la misma vía de entrada y son capaces de infectar a otros individuos en el mismo ambiente, probablemente asociado con factores del huésped relacionados a un estado de inmunocompromiso, como estrés, enfermedades asociadas, o carencia de nutrientes.

El uso de marcadores moleculares específicos para determinar la presencia de algún parásito dentro del huésped ha sido muy utilizado en los años recientes con fines diagnóstico, epidemiológico y ecológico. Entre los marcadores moleculares disponibles en *H. capsulatum* destaca un fragmento del gen *Hcp100*, mientras que en *Pneumocystis* spp. se han utilizado las subunidades *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA* del rRNA mitocondrial para identificar las distintas especies del parásito según sus huéspedes y para estudios filogenéticos.

En el presente estudio se propone investigar la co-infección de ambos patógenos fúngicos y la infección individual por cada patógeno en poblaciones de murciélagos silvestres, además de contribuir al conocimiento del papel que juega el murciélago como dispersor de ambos parásitos en la naturaleza. En el caso de la histoplasmosis, la información generada sobre la dispersión de su agente etiológico aportaría datos relevantes para su epidemiología. Estudios de este tipo abren la puerta para un mejor entendimiento de las relaciones interespecíficas de parásitos en un mismo huésped.

HIPÓTESIS

El uso de los marcadores moleculares, fragmento del gen *Hcp100* y del gen del antígeno M, así como de los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*, permitirán evidenciar la presencia de *H. capsulatum* y *Pneumocystis* spp., respectivamente, en los tejidos de murciélagos naturalmente infectados y determinar los porcentajes de la co-infección de ambos patógenos y de la infección individual de cada uno de ellos en la naturaleza.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la co-infección de *H. capsulatum* y *Pneumocystis* spp. y sus respectivas infecciones individuales para explorar el papel potencial de murciélagos de vida libre en la ecología y en la relación interespecífica de ambos patógenos.

Objetivos particulares

- 1) Determinar la frecuencia de la co-infección de ambos hongos y de la infección individual de *H. capsulatum* y *Pneumocystis* spp. en su huésped silvestre murciélago.
- 2) Conocer la distribución geográfica de ambos patógenos en poblaciones de murciélagos.
- 3) Conocer el porcentaje de murciélagos que presentan diseminación de *H. capsulatum* a bazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de murciélagos

Ciento veintidós murciélagos de diferentes especies y patrones ecológicos procedentes de tres países de Latinoamérica, fueron capturados aleatoriamente: 21 de Argentina, 13 de Guyana Francesa, y 88 de México. Las especies capturadas, el número de murciélagos por especie y su origen geográfico se muestran en la Tabla 1.

Los murciélagos capturados en México fueron llevados al laboratorio, de preferencia vivos, donde fueron sacrificados por dislocación cervical cumpliendo con las recomendaciones del Comité de Usos y Cuidados de Animales de Laboratorio, de la Facultad de Medicina, UNAM, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-Z00-1999). Los ejemplares sacrificados fueron congelados a -20 °C hasta la necropsia. Los murciélagos capturados en Argentina fueron sacrificados *in situ* por dislocación cervical y sus órganos fueron preservados en etanol al 70% y enviados a México. A cada uno de los ejemplares capturados en México y Argentina se les asignó un número de código y fueron preparados como se describe en Taylor et al. (1999a). Datos del sexo, medidas somáticas, condición reproductiva, peso y edad (determinada por la naturaleza del pelo y osificación de las falanges) fueron registrados por investigadores especialistas en el manejo de estos animales, tanto del Instituto de Ecología de la UNAM como del Instituto Lillo, de Tucumán, Argentina. Todos los ejemplares fueron identificados y preparados como lo descrito por Anthony (1988) y Handley (1988). La determinación taxonómica fue realizada de acuerdo con Hall (1981) y Wilson y Reeder (1993).

Después de sacrificados los animales, se procesaron los siguientes órganos: 1) pulmón, el cual es el blanco primario tanto para *H. capsulatum* como para *Pneumocystis* spp.; 2) bazo, en el cual se realizaron los ensayos para comprobar la diseminación de *H. capsulatum*.

Las muestras de órganos procesadas fueron removidas asépticamente y congeladas a -20 °C hasta la extracción de DNA.

Los murciélagos de Guyana Francesa fueron procesados *in situ* y sólo se extrajo el DNA de pulmón el cual fue enviado a México para los análisis correspondientes.

Extracción de DNA

El DNA total de cada pulmón y bazo fue extraído utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) y mantenido en congelación a -20 °C hasta su uso. Las muestras de DNA de pulmón y bazo fueron procesadas para detectar la presencia de *H. capsulatum*, mientras que para la detección de *Pneumocystis* sp. sólo se realizaron los ensayos en muestras de pulmón.

Tabla 1. Especie, número y procedencia geográfica de los murciélagos estudiados

Especies	Procedencia geográfica								
	Argentina		Guyana Francesa	México					
	TUC	CBA	ND	CS	MN	GR	HG	MS	NL
<i>Artibeus hirsutus</i>								5	
<i>Carollia perspicillata</i>			1						
<i>Glossophaga soricina</i>			12			4			
<i>Mormoops megalophylla</i>						2			1
<i>Myotis californicus</i>									1
<i>Natalus stramineus</i>						8			
<i>Pteronotus davyi</i>						1			
<i>Pteronotus parnellii</i>						2	1		
<i>Tadarida brasiliensis</i>	16	5		8	8		20		27

Abreviaciones: TUC= Tucumán; CBA= Córdoba; CS= Chiapas; MN= Michoacán; GR= Guerrero; HG= Hidalgo; MS= Morelos; NL= Nuevo León; ND= No definido.

Detección molecular de *H. capsulatum* por PCR

Para determinar la presencia de este patógeno se realizaron dos ensayos de PCR. El primer consistió de una PCR-anidada para el marcador molecular *Hcp100*, según lo descrito por Bialek et al. (2002) y con modificaciones menores implementadas por Taylor et al. (2005b) que no modificaron la especificidad y sensibilidad del marcador *Hcp100*. El segundo ensayo fue una PCR convencional para un fragmento del gen del antígeno M, según lo descrito por Zancopé-Oliveira et al. (1999).

Detección molecular de la presencia de *H. capsulatum* por PCR-anidada del marcador *Hcp100*

Para este ensayo se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos descritos por Bialek et al., (2002). El par de oligonucleótidos externos para la primera reacción fue: HcI (5'-GCGTTCCGAGCCTTCCACCTCAAC-3') (sentido) y HcII (5'-ATGTCCCATCGGGCGCCGTGTAGT-3') (antisentido). La primera PCR se realizó con un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción que contiene: desoxinucleósidos trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP) (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) 200 µM de cada uno, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótidos externos 100 pmoles de cada uno, 1 U *Taq* DNA polimerasa (Applied Biosystems) y 4 µl del DNA de pulmón o bazo de murciélago como molde. Se realizaron diversos ensayos variando la concentración del DNA. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo a 94 °C-5 min; 35 ciclos a 94 °C-30 s, 50 °C-30 s, 72 °C-1 min; y un ciclo de extensión final a 72 °C-5 min. El fragmento amplificado en la primera PCR se utilizó como molde para la segunda reacción (anidada) con el par de oligonucleótidos internos: HcIII (5'-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3') (sentido) y HcIV (5'-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3') (antisentido) que amplificaron un fragmento de 210 pb que es único para *H. capsulatum*. La mezcla para la reacción anidada consistió de dNTPs 200 µM de cada uno, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótidos internos 100 pmoles de cada uno, 1 U de *Taq* DNA polimerasa y 2 µl del producto de la primera PCR (molde). Las condiciones de ciclado para la reacción anidada fueron: un ciclo a 94 °C-5 min; 30 ciclos a 94 °C-30 s, 65 °C-30 s, 72 °C-1 min; y un ciclo de extensión final a 72 °C-5 min. Se utilizó como testigo positivo de amplificación el DNA de la cepa EH-53 de *H. capsulatum* en una concentración de 20 ng, mientras que el agua Milli Q fue procesada como testigo negativo.

Para comprobar la especificidad del marcador *Hcp100* se realizaron ensayos adicionales utilizando DNAs heterólogos de hongos y mamíferos: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Coccidioides immitis* y *Aspergillus fumigatus*; asimismo, se procesaron DNAs de pulmón de rata, ratón y de un murciélago no infectado (M-461P) para descartar amplificación inespecífica de tejido de mamífero. En estos ensayos se utilizaron como testigo positivo el DNA de la cepa EH-53 de *H. capsulatum* y el DNA de un murciélago infectado comprobado por cultivo positivo (M-437P), mientras que el agua Milli Q fue procesada como testigo negativo.

Determinación de la diseminación de *H. capsulatum* utilizando el marcador *Hcp100*

Para determinar la diseminación de *H. capsulatum*, se procesaron ensayos de PCR-anidada con el marcador *Hcp100* utilizando DNAs de bazo de los murciélagos que previamente habían amplificado en tejido de pulmón la banda de 210 pb característica de este marcador. Se utilizaron los mismos testigos positivo y negativo procesados para el ensayo de pulmón.

Detección molecular de la presencia de *H. capsulatum* por PCR convencional para el marcador del antígeno M

Para este ensayo se utilizaron dos oligonucleótidos descritos por Guedes et al. (2003): Msp2F (5'-CGGGCCGCGTTTAAACAGCGCC-3') y Msp2R (5'-ACCAGCGGCCATAAGGACGTC-3'), y el producto de la reacción generó un fragmento de 279 pb. La PCR se realizó con un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción que consistió de dNTPs 200 µM de cada uno, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótidos 100 pmoles de cada uno, 1 U *Taq* DNA polimerasa y 10 µl de DNA (sólo de pulmón) como molde. Se realizaron diversos ensayos variando la concentración del DNA. Las condiciones de ciclado fueron: un ciclo a 94 °C-5 min; 35 ciclos a 94 °C-30 s, 65 °C-30 s, 72 °C-1 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C-5 min. Se utilizó como testigo positivo de amplificación el DNA (30 ng) de la cepa EH-53 de *H. capsulatum*, mientras que el agua Milli Q fue procesada como testigo negativo.

Detección molecular de *Pneumocystis* sp. por PCR

Para determinar la presencia de este patógeno se realizaron dos ensayos de PCR-anidada. El primer ensayo fue realizado según lo descrito por Wakefield (1996) y Wakefield et al. (1990) para el marcador molecular *mtLSUrRNA*. El segundo ensayo se realizó según lo descrito por Tsolaki et al. (1998) para el marcador *mtSSUrRNA*.

Detección molecular de la presencia de *Pneumocystis* sp. por PCR-anidada del marcador *mtLSUrRNA*

Para este ensayo se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos universales para *Pneumocystis* spp. El par de oligonucleótidos externos para la primera reacción fue: pAZ102H (5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3') (sentido) y pAZ102E (5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3') (antisentido) descritos por Wakefield et al. (1990). La

primera PCR se realizó con un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción que contiene: dNTPs 500 µM de cada uno, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos externos 100 µM de cada uno, 1 U *Taq* DNA polimerasa y 2.5 µl del DNA de pulmón de murciélago como molde. Las condiciones de ciclado fueron: 94 °C-2 min; 30 ciclos a 94 °C-30 s, 50 °C-1 min, 65 °C-1 min; un ciclo de extensión final de 65 °C-2 min. El fragmento amplificado en la primera PCR se utilizó como molde para la reacción anidada con el par de oligonucleótidos internos: pAZ102X (5'-GTGAAATACAAATCGGACTAGG-3') (sentido) y pAZ102Y (5'-TCACTTAATATTAATTGGGGAGC-3') (antisentido) descritos por Wakefield (1996) que delimita un fragmento de 267 pb. La mezcla para la reacción anidada consistió de: dNTPs 500 µM de cada uno, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos internos 100 µM de cada uno, 1 U *Taq* DNA polimerasa y 2.5 µl de DNA de la primera PCR (molde). Las condiciones de ciclado para la reacción anidada fueron: un ciclo a 94 °C-2 min; 30 ciclos a 94 °C-30 s, 55 °C-1 min, 65 °C-1 min; un ciclo de extensión final a 65 °C-2 min. Se utilizó como testigo positivo DNA de conejo infectado con *Pneumocystis* y agua Milli Q como testigo negativo.

Detección molecular de la presencia de *Pneumocystis* sp. por PCR-anidada del marcador *mtSSUrRNA*

Para este ensayo se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos universales para *Pneumocystis* spp. descritos por Tsolaki et al. (1998). El par de oligonucleótidos externos para la primera reacción fue: pAZ112-10F (5'-GGGAATTCTAGACGGTCACAGAGATCAG-3') (sentido) y pAZ112-10R (5'-GGGAATTCGAACGATTACTAGCAATCCC-3') (antisentido). La primera PCR se realizó con un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción que contiene: dNTPs 500 µM, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos externos 100 µM de cada uno, 1 U *Taq* DNA polimerasa y 2.5 µl de DNA de pulmón de murciélago como molde. Las condiciones de ciclado fueron: 94 °C-2 min; 40 ciclos a 94 °C-35 s, 55 °C-1 min, 65 °C-1 min; y una extensión final de 65 °C-5 min. El fragmento amplificado en la primera PCR se utilizó como molde para la reacción anidada con el par de oligonucleótidos internos: pAZ112-13R1 (5'-GGGAATTCGAAGCATGTTGTTTAATTCG-3') (sentido) y pAZ112-14R1 (5'-GGGAATTCTTCAAAGAATCGAGTTTCAG-3') (antisentido) que delimita un fragmento de 300 pb. La mezcla para la reacción anidada consistió de: dNTPs 500 µM de cada uno, MgCl₂ 1.5 mM, oligonucleótidos internos 100 µM de cada uno, 1 U *Taq* DNA polimerasa y 2.5 µl de DNA de la primera PCR (molde). Las condiciones de ciclado para la reacción anidada fueron: un ciclo a 94 °C-2 min; 10 ciclos a 94 °C-30 s, 52 °C-1 min, 65 °C-1 min; 30

ciclos a 94 °C-30 s, 63 °C-1 min, 65 °C-1 min; y una extensión final de 65 °C-5 min. Se utilizó como testigo positivo DNA de conejo infectado con *Pneumocystis* y agua Milli Q como testigo negativo.

Visualización de los amplicones

Todos los amplicones obtenidos para cada uno de los marcadores probados para ambos patógenos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% utilizando como marcador de tamaño molecular DNA Ladder 100-pb (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Las bandas amplificadas se observaron utilizando un transiluminador-UV después de haber sido teñida con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Las imágenes de cada gel fueron guardadas en formato Tiff para ser editadas posteriormente.

Obtención de las secuencias

Los productos amplificados de todas las PCRs realizadas para los marcadores moleculares de ambos patógenos, fueron purificados utilizando los kits “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen, Valencia, CA) y “QIAEX II Gel Extraction” (Qiagen) para los amplicones de *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp., respectivamente. Posteriormente fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, para la secuenciación de ambas hebras (sentido y anti-sentido) en un aparato ABI-automated DNA sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Se generaron secuencias consenso para cada muestra/marcador. Todas las secuencias obtenidas de *H. capsulatum* para el marcador *Hcp100* fueron depositadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>), mientras que las obtenidas para los marcadores de *Pneumocystis* sp. están consideradas en el trabajo de Derouiche et al. (2009).

Análisis de secuencias por BLASTn y BLASTx

Se utilizaron los algoritmos BLASTn y BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para realizar búsquedas en la base de datos del GenBank de secuencias homólogas de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Este análisis fue planteado por la posible existencia de fragmentos amplificados por la PCR-anidada del marcador *Hcp100* a partir de DNAs de muestras testigos.

Criterio de inclusión para considerar los murciélagos infectados con cada patógeno

Las muestras procesadas fueron consideradas como indicadoras de presencia del patógeno cuando se obtuvo la secuencia de al menos uno de los dos marcadores utilizados para cada patógeno.

Análisis estadístico

Los porcentajes de infección y de co-infección, así como el intervalo de confianza (95% IC) calculado por distribución normal, fueron estimados con base en la infección individual de cada patógeno y en la co-infección de ambos, considerando los datos de las muestras procesadas por país y el número total de muestras estudiadas.

RESULTADOS

Las 122 muestras de DNA de pulmón utilizadas en este estudio, corresponden a nueve especies de murciélagos procedentes de tres países de Latinoamérica (Tabla 1) agrupadas en cinco familias (Tabla 2).

Tabla 2. Especies y familias de los murciélagos utilizados

Especies	Familia
<i>T. brasiliensis</i>	Molossidae
<i>M. megalophylla</i> <i>P. davyi</i> <i>P. parnellii</i>	Mormoopidae
<i>N. stramineus</i>	Natalidae
<i>A. hirsutus</i> <i>C. perspicillata</i> <i>G. soricina</i>	Phyllostomidae
<i>M. californicus</i>	Vespertilionidae

La figura 3 muestra el porcentaje de cada especie de murciélagos estudiados. Del total de murciélagos estudiados 84 (69%) correspondieron a *T. brasiliensis*, de los cuales 21 (25%) fueron capturados en Argentina y 63 (75%) en México, siendo *T. brasiliensis* la especie con mayor número de ejemplares estudiados.

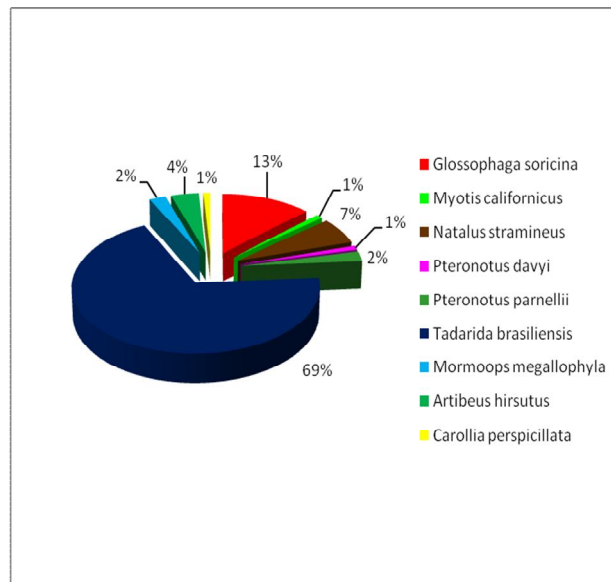


Figura 3. Representación porcentual de las especies de murciélagos estudiados. Los datos representados fueron obtenidos tomando en cuenta el número total de murciélagos por especie en relación con el total de ejemplares procesados.

De las nueve especies de murciélagos predominaron los insectívoros, mientras que dos fueron frugívoras y una nectarívora-polinívora. Los demás hábitos conductuales variaron considerablemente entre las especies estudiadas (Tabla 3).

Tabla 3. Hábitos conductuales y patrón de distribución geográfica de las especies capturadas

Especies	Migración	Alimentación	Tamaño de la colonia	Patrón de distribución geográfica
<i>A. hirsutus</i>	No migratorio	Frugívoro	No definido	Endémico para México
<i>C. perspicillata</i>	No migratorio	Frugívoro	Pequeños grupos de 10 a 100 individuos	De México al sur de Bolivia, Brasil y Paraguay
<i>G. soricina</i>	No migratorio	Nectarívoro, polinívoro	De un número pequeño a 2.000 individuos	Desde México hasta Brasil, norte de Argentina y algunas islas del Caribe
<i>M. megalophylla</i>	Migratorio	Insectívoro	De pocos a miles de individuos	Desde el sur de Estados Unidos hasta Venezuela y Perú
<i>M. californicus</i>	Ocasionalmente migratorio	Insectívoro	Grupos pequeños o gregarios	Desde el oeste de Canadá y Estados Unidos a Guatemala
<i>N. stramineus</i>	No migratorio	Insectívoro	Alrededor de 10.000 individuos	Desde el norte de México hasta Brasil
<i>P. davyi</i>	No migratorio	Insectívoro	De cientos a miles de individuos	Desde el norte de México hasta Brasil
<i>P. parnellii</i>	No migratorio	Insectívoro	Miles de individuos	Desde el norte de México al norte de Argentina y Paraguay
<i>T. brasiliensis</i>	Migratorio	Insectívoro	De miles a millones de individuos	Desde el centro de Estados Unidos hasta Chile y Argentina

Los datos referidos en la tabla fueron tomados de Ceballos y Oliva (2005).

Detección molecular de la presencia de *H. capsulatum* en pulmón de murciélagos con el marcador *Hcp100*

Datos totales para los tres países de Latinoamérica

De 122 muestras de pulmón de murciélagos estudiados para Argentina, Guyana Francesa y México se obtuvieron secuencias del marcador *Hcp100* de *H. capsulatum* en pulmón de 98 murciélagos, lo que sugiere la presencia del patógeno en estos ejemplares, considerando los criterios de inclusión mencionados en materiales y métodos.

El porcentaje total de infección obtenido para Latinoamérica fue de 80.3% (95% IC = 83.7-73.3%).

Datos totales por país

Argentina:

De 21 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de Argentina, se obtuvieron 19 secuencias del marcador *Hcp100* (números de acceso del GenBank vienen referidos en González-González et al., 2011).

Los productos amplificados de nueve muestras representativas se muestran en la figura 4, donde la presencia de bandas nítidas del marcador *Hcp100* (210 pb) y la ausencia de bandas inespecíficas están representadas.

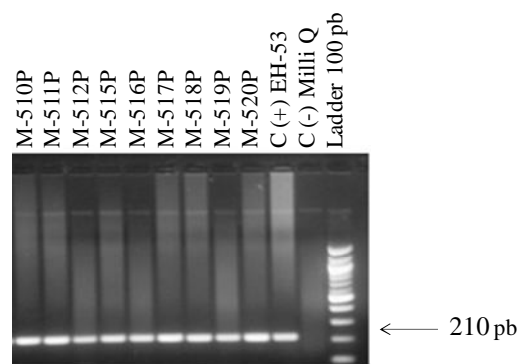


Figura 4. Gel de agarosa de la amplificación del marcador *Hcp100*, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de Argentina. La imagen muestra la amplificación del marcador de *H. capsulatum* en nueve muestras representativas (M-510P-M-512P, M-515P-M-520P) de DNA de pulmón de murciélagos. Se observa el producto amplificado del DNA de la cepa EH-53 (testigo positivo) y la ausencia de la banda de 210 pb del marcador en el agua Milli Q (testigo negativo). Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

Los datos totales de infección y por sitio de captura para la única especie de murciélago (*T. brasiliensis*) procedente de Argentina se muestran en la tabla 4, donde además se incluyeron

los porcentajes estimados de infección. Destaca el 90.4% (95% IC = 95.4-85.4%) de infección para los murciélagos procedentes de Argentina, donde el 100% fue encontrado para los ejemplares capturados en Tucumán.

Tabla 4. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Argentina, detectados con el marcador *Hcp100*

Especie	Número de murciélagos infectados /Número total de murciélagos estudiados por localidad		Infección (%)
	Tucumán	Córdoba	
<i>T. brasiliensis</i>	16/16	3/5	90.4
Infección (%)	100	60	90.4

Guyana Francesa:

De 13 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de Guyana Francesa, se obtuvieron cuatro secuencias del marcador *Hcp100* correspondientes a las muestras G-8P, G-12P, G-13P y G-18P (ver anexo 1).

Los productos amplificados de tres muestras (G-8P, G-12P y G-13P) al igual que dos muestras (G-14P y G-15P) que no amplificaron el marcador se muestran en la figura 5. De modo similar a la figura anterior destaca la presencia de bandas nítidas del marcador *Hcp100* (210 pb) y la ausencia de bandas inespecíficas.

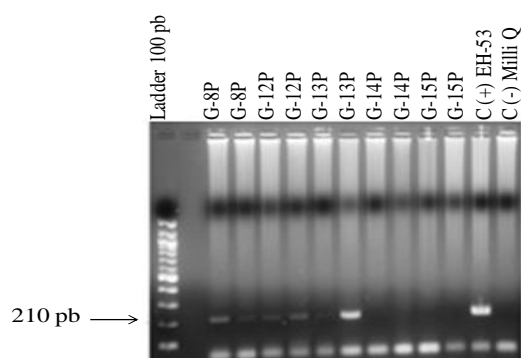


Figura 5. Gel de agarosa de la amplificación del marcador *Hcp100*, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de Guyana Francesa. La imagen muestra la amplificación del marcador de *H. capsulatum* en tres muestras representativas (G-8P, G-12P y G-13P) de DNA de pulmón de murciélagos. Se observa el producto amplificado del DNA de la cepa EH-53 (testigo positivo) y la ausencia de la banda de 210 pb del marcador en el agua Milli Q (testigo negativo). Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

Los datos totales así como los porcentajes estimados de infección para las dos especies de murciélagos procedentes de Guyana Francesa se muestran en la tabla 5. El porcentaje total de infección para los murciélagos procedentes de Guyana Francesa fue de 30.7%; (95% IC = 54.2-7.2%) y los porcentajes por especie fueron bajos, en vista de la limitación del número de ejemplares capturados.

Tabla 5. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Guyana Francesa, detectados con el marcador *Hcp100*

Espece	Número de murciélagos infectados / Número total de murciélagos estudiados	Infección (%)
<i>C. perspicillata</i>	1/1	*
<i>G. soricina</i>	3/12	25
Infección (%)	30.7	30.7

México:

De 88 muestras de DNA de pulmón de murciélago procedentes de México, se obtuvieron 75 secuencias del marcador *Hcp100*, de las cuales 54 fueron depositadas en el GenBank con números de acceso según González-González et al. (2011) y las 21 restantes vienen referidas en el anexo 1.

Los productos amplificados de cinco muestras (M-538P-M-542P) se muestran en la figura 6. Como en los geles anteriores destaca la presencia de bandas del marcador *Hcp100* (210 pb) y la ausencia de bandas inespecíficas.

Los datos totales así como los porcentajes estimados de infección para las ocho especies de murciélagos procedentes de México y por sitio de captura, se muestran en la tabla 6. El porcentaje total de infección para los murciélagos procedentes de México fue de 85.2% (95% IC = 92.4-78%), destacando que los porcentaje de infección variaron del 62 al 100% por localidad y del 62.5 al 100% por especie de murciélago.

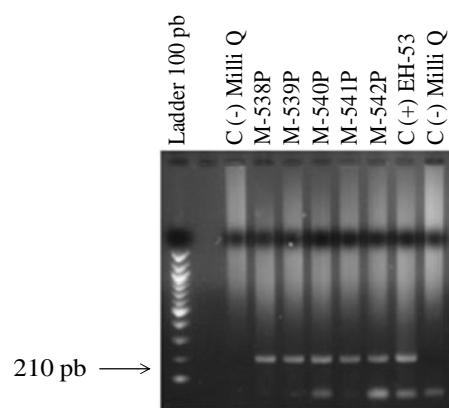


Figura 6. Gel de agarosa de la amplificación del marcador *Hcp100*, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de México. La imagen muestra la amplificación del marcador de *H. capsulatum* en cinco muestras representativas (M-538P-M-542P) de DNA de pulmón de murciélagos. Se observa el producto amplificado del DNA de la cepa EH-53 (testigo positivo) y la ausencia de la banda de 210 pb del marcador en el agua Milli Q (testigo negativo). Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

Tabla 6. Datos de infección de los murciélagos procedentes de México, detectados con el marcador *Hcp100*

Especie	Número de murciélagos infectados /Número total de murciélagos estudiados por localidad						Infección (%)
	CS	MN	GR	HG	MS	NL	
<i>A. hirsutus</i>					5/5		100
<i>G. soricina</i>			4/4				100
<i>M. megalophylla</i>			2/2			1/1	100
<i>M. californicus</i>						1/1	*
<i>N. stramineus</i>			5/8				62.5
<i>P. davyi</i>			1/1				*
<i>P. parnellii</i>			2/2	0/1			66.6
<i>T. brasiliensis</i>	8/8	7/8		13/20		26/27	85.7
Infección (%)	100	87.5	82.3	62	100	96.5	85.2

Abreviaciones: CS= Chiapas; MN= Michoacán; GR= Guerrero; HG= Hidalgo; MS= Morelos; NL= Nuevo León.

Determinación de la especificidad del marcador *Hcp100* utilizando DNA de hongos heterólogos y de tejidos de otros mamíferos

En la figura 7 se observa los resultados de los ensayos realizados para determinar la especificidad del marcador *Hcp100* utilizando DNAs heterólogos.

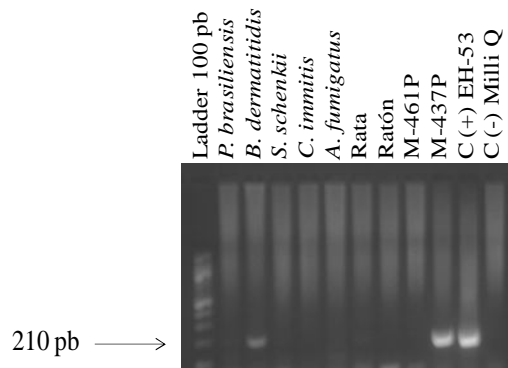


Figura 7. Gel de agarosa de la amplificación del marcador *Hcp100*, en muestras de DNAs heterólogos. La imagen muestra la ausencia de amplificación del marcador de *H. capsulatum* en muestras de DNAs de los hongos *P. brasiliensis*, *S. schenkii*, *C. immitis* y *A. fumigatus*, así como en DNA de pulmón de rata, ratón y del murciélago M-461P además del testigo negativo. Asimismo, la imagen muestra la amplificación de los DNAs de *B. dermatitidis*, del pulmón del murciélago M-437P y del testigo positivo (cepa EH-53). Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

No se observó amplificación de la banda de 210 pb en las muestras de DNA de los siguientes hongos heterólogos: *P. brasiliensis*, *S. schenkii*, *C. immitis* y *A. fumigatus*. Tampoco se reveló amplificación en los DNAs de pulmón de rata, ratón y del murciélago no infectado M-461P. Sin embargo, el DNA del hongo *B. dermatitidis* amplificó la banda de 210 pb de igual manera que los testigos positivos, DNA de la muestra de pulmón del murciélago infectado M-512P y DNA de la cepa testigo positivo (EH-53) (Figura 7).

El producto amplificado de *B. dermatitidis* fue secuenciado, alineado y editado tomando como referencia la secuencia del marcador *Hcp100* de la cepa de *H. capsulatum* G-217B y la secuencia reportada de un factor de transcripción de la cepa SLH14081 de *Ajellomyces dermatitidis*. En el alineamiento también se incluyeron secuencias del marcador *Hcp100* de pulmón de murciélagos capturados en México y que forman parte de este estudio (M-426P, M-431P y M-433P). Para este análisis comparativo se consideraron 142 nucleótidos presentes

en la secuencia de *B. dermatitidis* y que se encuentran dentro del fragmento de 210 pb amplificado (Figura 8).

Se muestran en el alineamiento 22 sustituciones de las secuencias de *B. dermatitidis* con relación a las secuencias del marcador *Hcp100* de *H. capsulatum*. Las dos secuencias de *B. dermatitidis* son muy parecidas y sólo tienen una única sustitución, una adenina por una guanina (Figura 8).

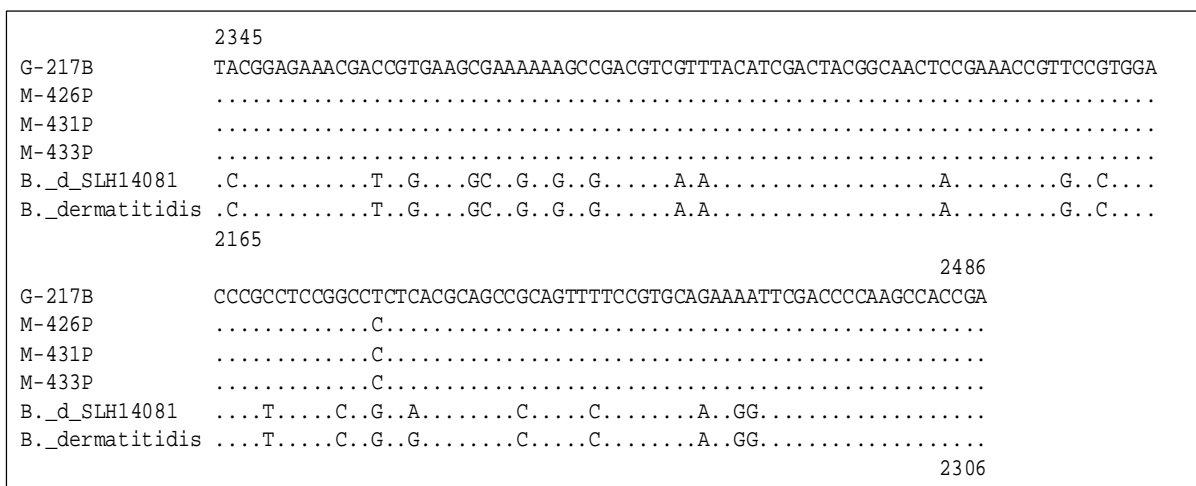


Figura 8. Alineamiento de las secuencias del marcador *Hcp100* de *H. capsulatum* con las secuencias de *B. dermatitidis*. El alineamiento se construyó con las secuencias de *H. capsulatum* de la cepa de G-217B (número de acceso en el GenBank AJ005963) y las obtenidas de pulmones de murciélagos infectados de México (M-426P, M-431P y M-433P), así como con las secuencias de la cepa de *B. dermatitidis* SLH14081 (número de acceso en el GenBank XM_002628281) y la secuencia de la muestra de DNA de *B. dermatitidis* amplificada en este estudio. En el alineamiento se consideraron 142 nucleótidos.

Dado los resultados no esperados para *B. dermatitidis*, se realizó un análisis de BLASTn utilizando la secuencia amplificada de *B. dermatitidis* que evidenció una similitud de 99% con la secuencia reportada en el GenBank para el factor de transcripción de *A. dermatitidis* de la cepa SLH14081 y de 86% con las secuencias del marcador *Hcp100* de *H. capsulatum* que se muestran en la figura 8. Por otro lado, el análisis por BLASTx realizado al fragmento de 142 nucleótidos de *B. dermatitidis*, mostró una identidad de 91% con la secuencia de aminoácidos de la proteína coactivadora p100 reportada para *H. capsulatum* (número de acceso en el GenBank ADW54550) y de 100% con la secuencia de aminoácidos reportada para el factor

de transcripción de *A. dermatitidis* de la cepa SLH14081 (número de acceso en el GenBank EEQ73005.1).

Determinación de la diseminación de *H. capsulatum* utilizando el marcador *Hcp100*

Los ensayos de diseminación de *H. capsulatum* a bazo se realizaron en 81 muestras de DNA de murciélagos de distintas localidades de México y Argentina, las cuales habían previamente generado secuencias del marcador *Hcp100* en pulmón. Estos ensayos no se realizaron con los murciélagos de Guyana Francesa debido a que no se procesaron bazos de estos ejemplares.

De las 81 muestras (62 de México y 19 de Argentina) se obtuvieron 44 secuencias de murciélagos de México y 18 de Argentina, lo que corresponde a un total de 62 secuencias de *Hcp100* procedentes de muestras de bazo de ejemplares infectados (ver anexo 2), lo que equivale a un porcentaje de diseminación del 76.5% (95% IC = 85.7-67.3%) (Tabla 7).

Tabla 7. Datos de diseminación de *H. capsulatum* a bazo de murciélagos, detectados con el marcador *Hcp100*

Especie	Número de murciélagos con diseminación a bazo/ Número total de murciélagos estudiados por localidad								Infección (%)
	Argentina		México						
	TUC	CBA	CS	MN	GR	HG	MS	NL	
<i>A. hirsutus</i>							4/5		80
<i>G. soricina</i>					4/4				100
<i>M. megalophylla</i>					2/2				100
<i>M. californicus</i>									*
<i>N. stramineus</i>					4/4				100
<i>P. davyi</i>					0/1				*
<i>P. parnellii</i>					2/2				100
<i>T. brasiliensis</i>	16/16	2/3	0/8	6/7		9/12		13/16	63.6
Infección (%)	100	66.6	*	85.7	92.3	69.2	80	81.2	76.5

Abreviaciones: TUC= Tucumán; CBA= Córdoba; CS= Chiapas; MN= Michoacán; GR= Guerrero; HG= Hidalgo; MS= Morelos; NL= Nuevo León.

Detección molecular de la presencia de *H. capsulatum* en pulmón de murciélagos con el marcador del antígeno M

Datos totales para los tres países de Latinoamérica

De 98 muestras de pulmón que amplificaron el marcador *Hcp100* de *H. capsulatum* de murciélagos procedentes de Argentina, Guyana Francesa y México, sólo 20 de éstas amplificaron la banda de 279 pb del marcador del antígeno M. De las 20 muestras amplificadas, 19 correspondieron a México (M-431P, M-433P-M-435P, M-437P, M-441P, M-447P, M-448P, M-456P-M-458P, M-470P, M-471P, M-476P, M-478P, M-480P, M-490P, M-501P y M-509P) y una a Guyana Francesa (G-12P). En la figura 9 se observa la banda de 279 pb en dos muestras representativas (M-501P y M-509P), donde se revelan además bandas inespecíficas de menor tamaño molecular.

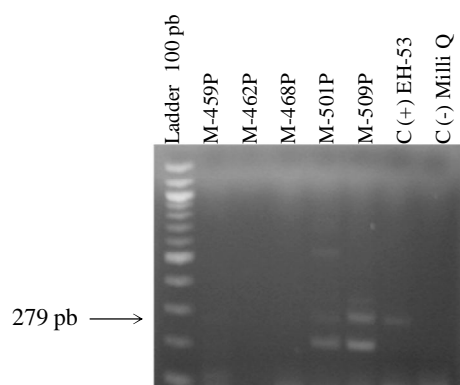


Figura 9. Gel de agarosa de la amplificación del marcador del antígeno M, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de México. La imagen muestra la amplificación del marcador del antígeno M en dos muestras representativas (M-501P y M-509P). El DNA de la cepa EH-53 fue utilizado como testigo positivo y el agua Milli Q como testigo negativo. Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

Para el marcador del antígeno M, sólo se logró la secuenciación del testigo positivo que corresponde al DNA de la cepa EH-53. La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia de la cepa de referencia G-217B depositada en el GenBank. La figura 10 muestra el alineamiento de ambas secuencias. Destaca una alta similitud entre las dos secuencias, lo que nos indica que la banda amplificada del DNA de la cepa EH-53 corresponde a un fragmento de 222 nucleótidos ubicado dentro del fragmento de 279 pb del gen del antígeno M y no se debe a artefactos de la técnica. Asimismo, se observan cinco sustituciones en la secuencia de la cepa EH-53 con relación a la secuencia de la cepa G-217B, las cuales son: guanina por citosina en la posición del nucleótido 2871; adenina por guanina en el nucleótido 2872; guanina

por adenina en el nucleótido 2906, citosina por timina en el nucleótido 2907; y guanina por adenina en el nucleótido 2981.



Figura 10. Alineamiento de las secuencias del fragmento del gen del antígeno M de *H. capsulatum*. La imagen muestra el alineamiento de las secuencias de la cepa de referencia G-217B (número de acceso del GenBank AF026268) y de la cepa EH-53 (testigo positivo del marcador). El alineamiento comprende 222 nucleótidos y destacan cinco sustituciones en la secuencia de la cepa EH-53 con relación a la secuencia de la cepa de referencia.

Detección molecular de la presencia de *Pneumocystis* sp. en pulmón de murciélagos con los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*

Datos totales para los tres países de Latinoamérica

De 122 muestras de pulmón de murciélagos estudiados para Argentina, Guyana Francesa y México 52 ejemplares amplificaron uno o ambos marcadores de *Pneumocystis* sp. Se obtuvieron 47 secuencias del marcador *mtLSUrRNA* y 46 del marcador *mtSSUrRNA*, lo que representa un porcentaje total de infección de 42.6% (95% IC= 51.2-34%) con los dos marcadores, para los tres países estudiados.

Datos totales por país

Argentina:

De 21 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de Argentina, se obtuvieron 7 secuencias del marcador *mtLSUrRNA* y 7 del marcador *mtSSUrRNA* de *Pneumocystis* sp., reportadas en Derouiche et al. (2009).

Los productos amplificados de tres muestras representativas del marcador *mtLSUrRNA* se muestran en la figura 11. La visualización en gels de agarosa de los productos amplificados de este marcador evidencia la banda esperada de 267 pb y, en algunas muestras (M-511P y M-512P), se observan bandas inespecíficas de mayor tamaño molecular (Figura 11).

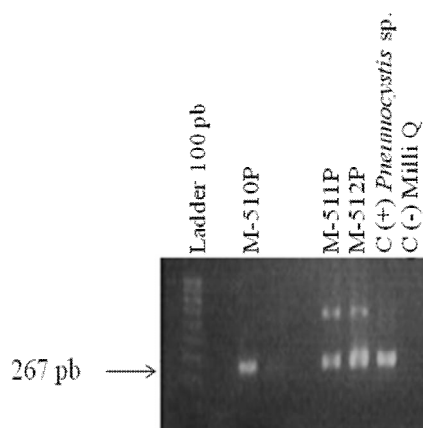


Figura 11. Gel de agarosa de la amplificación del marcador *mtLSUrRNA* de *Pneumocystis* sp., en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de Argentina. La imagen muestra la amplificación del marcador *mtLSUrRNA* en tres muestras representativas (M-510P, M-511P y M-512P) de DNA de pulmón de murciélagos. El DNA de *Pneumocystis* sp. obtenido de conejo fue utilizado como testigo positivo y el agua Milli Q como testigo negativo. Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

Los datos totales de infección y por sitio de captura para la única especie de murciélago (*T. brasiliensis*) procedente de Argentina se muestran en la tabla 8. El porcentaje total de infección para los murciélagos capturados Argentina con ambos marcadores fue de 38% (95% IC = 58.5-17.5%) donde el 50% fue encontrado para los ejemplares capturados en Tucumán.

Tabla 8. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Argentina, detectados con los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*

Especie	Número de murciélagos infectados detectados con uno o ambos marcadores / Número total de murciélagos estudiados por localidad		Infección (%)
	Tucumán	Córdoba	
<i>T. brasiliensis</i>	8/16	0/5	38
Infección (%)	50	---	38

Guyana Francesa:

De 13 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de Guyana Francesa, se obtuvieron seis secuencias del marcador *mtLSUrRNA* y seis del marcador *mtSSUrRNA* que fueron reportadas en Derouiche et al. (2009).

Los productos amplificados fueron resueltos en geles de agarosa y para cada marcador se obtuvo la banda esperada característica (datos no mostrados).

Los datos totales de infección con los dos marcadores específicos de *Pneumocystis* sp. para las dos especies de murciélago procedentes de Guyana Francesa se muestran en la tabla 9. El porcentaje total de infección para los murciélagos capturados en Guyana Francesa fue de 46.1% (95% IC = 73.1-19.1%) y el porcentaje por especie sólo fue representativo para *G. soricina* (50%).

Tabla 9. Datos de infección de los murciélagos procedentes de Guyana Francesa, detectados con los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*

Especie	Número de murciélagos infectados detectados con uno o ambos marcadores / Número total de murciélagos estudiados	Infección (%)
<i>C. perspicillata</i>	0/1	0
<i>G. soricina</i>	6/12	50
Infección (%)	46.1	46.1

México:

De 88 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de México, se obtuvieron 34 secuencias del marcador *mtLSUrRNA* que correspondieron a 26 muestras de DNA de pulmón

de *T. brasiliensis* y tres de *G. soricina* reportadas por Derouiche et al. (2009), siendo que las cinco secuencias restantes fueron referidas en Akbar et al. (2012). Asimismo, se obtuvieron 33 secuencias del marcador *mtSSUrRNA*, de las cuales 28 correspondieron a muestras de DNA de murciélagos *T. brasiliensis* y dos de *G. soricina* que fueron reportadas en Derouiche et al. (2009), siendo que las tres secuencias restantes fueron referidas en Akbar et al. (2012). Los productos amplificados de seis muestras representativas del marcador *mtSSUrRNA* se observan en la figura 12, donde se revelaron las bandas esperadas de 300 pb sin bandas inespecíficas.

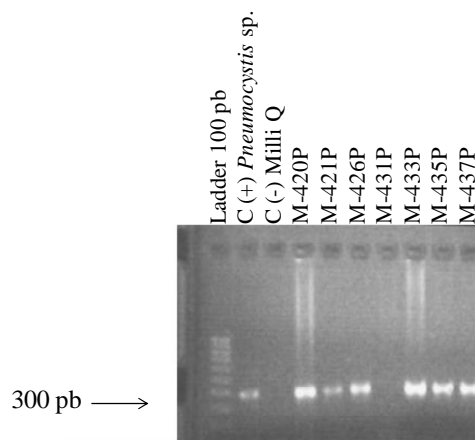


Figura 12. Gel de agarosa de la amplificación del marcador *mtSSUrRNA*, en muestras de DNA de pulmón de murciélagos de México. La imagen muestra la amplificación del marcador de *Pneumocystis* sp. en seis muestras representativas (M-420P, M-421P, M-426, M-433P, M-435P y M-437P) de DNA de pulmón de murciélagos. El DNA de *Pneumocystis* sp. obtenido de conejo fue utilizado como testigo positivo y el agua Milli Q como testigo negativo. Ladder 100 pb = marcador de tamaño molecular.

Los datos totales de infección con los dos marcadores específicos para *Pneumocystis* sp. por sitio de captura para las ocho especies de murciélagos procedentes de México se muestran en la tabla 10. El porcentaje total de infección para los murciélagos procedentes de México fue de 46.5% (95% IC = 56.8-36.2%), destacando que los porcentaje de infección variaron del 23.5 al 75.8% por localidad y del 12.5 al 75% por especie de murciélagos (Tabla 10).

Tabla 10. Datos de infección de los murciélagos procedentes de México, detectados con los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*

Especie	Número de murciélagos infectados detectados con uno o ambos marcadores / Número total de murciélagos estudiados por localidad						Infección (%)
	CS	MN	GR	HG	MS	NL	
<i>A. hirsutus</i>					3/5		60
<i>G. soricina</i>			3/4				75
<i>M. megalophylla</i>			0/2			0/1	*
<i>M. californicus</i>						1/1	*
<i>N. stramineus</i>			1/8				12.5
<i>P. davyi</i>			0/1				*
<i>P. parnellii</i>			0/2	1/1			*
<i>T. brasiliensis</i>	3/8	3/8		5/20		21/27	50.7
Infección (%)	37.5	37.5	23.5	28.5	60	75.8	46.5

Abreviaciones: CS= Chiapas; MN= Michoacán; GR= Guerrero; HG= Hidalgo; MS= Morelos; NL= Nuevo León.

Detección molecular de la co-infección de *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. en pulmón de murciélagos

De 122 muestras de pulmón de murciélagos estudiados para Argentina, Guyana Francesa y México se obtuvieron secuencias de al menos un marcador específico para cada patógeno en 50 ejemplares. El porcentaje total de co-infección obtenido para los tres países estudiados fue de 40.9% (95% IC = 49.5-32.3%).

Datos totales por país

Argentina:

De 21 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de Argentina, se obtuvieron secuencias de al menos un marcador específico para cada patógeno en pulmón de 8 ejemplares.

Los datos totales de co-infección y por sitio de captura para la única especie de murciélago (*T. brasiliensis*) procedente de Argentina se muestran en la tabla 11. El porcentaje total de co-infección para Argentina fue de 38% (95% IC = 58.5-17.5%) donde el 50% fue encontrado para los ejemplares capturados en Tucumán.

Tabla 11. Datos de co-infección de los murciélagos procedentes de Argentina

Especie	Número de murciélagos co-infectados/ Número total de murciélagos estudiados por localidad		Co-infección (%)
	Tucumán	Córdoba	
<i>T. brasiliensis</i>	8/16	0/5	38
Co-infección (%)	50	---	38

Guyana Francesa:

De 13 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de Guyana Francesa, se obtuvieron secuencias de al menos un marcador específico para cada patógeno en pulmón de 4 ejemplares.

Los datos totales así como los porcentajes estimados de co-infección para las especies de murciélago procedentes de Guyana Francesa se muestran en la tabla 12. El porcentaje total de co-infección para los murciélagos capturados en Guyana Francesa fue de 30.7% (95% IC = 33.8-27.6%) y el porcentaje por especie fue representativo únicamente para *G. soricina* (33.3%).

Tabla 12. Datos de co-infección de los murciélagos procedentes de Guyana Francesa

Especie	Número de murciélagos infectados / Número total de murciélagos estudiados	Co-infección (%)
<i>C. perspicillata</i>	0/1	0
<i>G. soricina</i>	4/12	33.3
Co-infección (%)	30.7	30.7

México:

De 88 muestras de DNA de pulmón de murciélagos procedentes de México, se obtuvieron secuencias de al menos un marcador específico para cada patógeno en pulmón de 38 ejemplares.

Los datos totales así como los porcentajes estimados de co-infección en las ocho especies de murciélagos procedentes de México se muestran en la tabla 13.

El porcentaje total de co-infección para los murciélagos procedentes de México fue de 43.1% (95% IC = 53.2-33%), destacando que los porcentaje de co-infección variaron del 14.2 al 75.8% por localidad y del 12.5 al 75% por especie de murciélago (Tabla 13).

Tabla 13. Datos de co-infección de los murciélagos procedentes de México

Especie	Número de murciélagos co-infectados/ Número total de murciélagos estudiados por localidad						Co-infección (%)
	CS	MN	GR	HG	MS	NL	
<i>A. hirsutus</i>					3/5		60
<i>G. soricina</i>			3/4				75
<i>M. megalophylla</i>			0/2			0/1	*
<i>M. californicus</i>						1/1	*
<i>N. stramineus</i>			1/8				12.5
<i>P. davyi</i>			0/1				*
<i>P. parnellii</i>			0/2	0/1			*
<i>T. brasiliensis</i>	3/8	3/8		3/20		21/27	47.6
Co-infección (%)	37.5	37.5	23.5	14.2	60	75.8	43.1

Abreviaciones: CS= Chiapas; MN= Michoacán; GR= Guerrero; HG= Hidalgo; MS= Morelos; NL= Nuevo León.

DISCUSIÓN

Se estudiaron nueve especies de murciélagos procedentes de tres países de Latinoamérica, con hábitos alimenticios así como conductas migratorias y coloniales distintas, para determinar la presencia en tejido (infección) de los patógenos *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. tanto en forma individual como conjunta (co-infección). Debido a su comportamiento colonial de formar grandes colonias, *T. brasiliensis* fue la especie mayormente representada en este estudio y, por ende, la que presentó porcentajes más elevados de infección y co-infección para los patógenos estudiados. Los demás hábitos conductuales asociados a las nueve especies de murciélagos estudiadas no influyeron en los porcentajes de infección encontrados para cada especie. Es importante señalar que es bastante aceptado que diferentes parásitos puedan compartir el mismo huésped, induciendo así lo que es conocido como co-infección. Este tipo de interacción ha sido poco estudiada, quizás debido a su complejidad y a las dificultades inherentes para su entendimiento (Cox, 2001).

H. capsulatum y *Pneumocystis* sp. son patógenos de mamíferos y tienen como órgano blanco primario el pulmón y comparten la misma vía (respiratoria) de entrada al huésped. Sin embargo, en el mecanismo de transmisión se presentan diferencias sutiles para ambos patógenos. La infección por *H. capsulatum* ocurre cuando un huésped susceptible inhala principalmente microconidios y fragmentos hifales (fase-M) aerosolizados en hábitats propicios para el hongo, mientras que en *Pneumocystis* sp. la transmisión de un individuo a otro por vía aérea es lo más común. Así, ambos mecanismos de transmisión difieren en el modo de adquirir los propágulos infectivos a partir de la fuente de infección, ya que para *H. capsulatum* éstos son aerosolizados en el ambiente externo donde se desarrollan en contraste de *Pneumocystis* spp. cuya fuente de infección es el individuo infectado que expele aerosoles contaminados con el patógeno por vía respiratoria, evento que nunca ha sido registrado en la transmisión de *H. capsulatum*.

Debido a las limitaciones asociadas a los métodos convencionales para el diagnóstico de ambas entidades clínicas, histoplasmosis y neumocistosis, en las últimas décadas se han introducido procedimientos moleculares para detectar la presencia de estos patógenos en diferentes muestras clínicas, incluyendo tejidos del huésped. Considerando lo anterior, para determinar el impacto de la infección de *H. capsulatum* y de *Pneumocystis* sp. o de la co-infección de ambos patógenos en poblaciones de murciélagos silvestres, se

seleccionaron dos marcadores moleculares específicos por cada patógeno estudiado. Para *H. capsulatum*, los fragmentos de los genes *Hcp100* y del antígeno M, y para *Pneumocystis* sp., los fragmentos de los genes *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA*.

Los murciélagos poseen un alto riesgo de infectarse con *H. capsulatum* debido a que este hongo desarrolla su fase M saprobia-geofílica en su guano. La asociación de estos mamíferos con *H. capsulatum* ha sido estudiada por distintos autores desde antes de los años 50s, incluyendo la detección del patógeno en sus tejidos (Aguirre-Pequeño, 1959; Bryles et al., 1969; Constantine, 1988; DiSalvo et al., 1969; Emmons, 1949; 1958; Emmons et al., 1966; González-Ochoa, 1963; Taylor et al., 1999a; 2012a; Tesh et al., 1967). Debido a esto es esencial reconocer el papel que tienen los murciélagos como reservorios y dispersores de este hongo en la naturaleza. En los inicios de los años 80s Hoff y Bigler (1981) propusieron el papel de los murciélagos como dispersores de *H. capsulatum* en el ambiente, a través de sus heces. Recientemente, se ha considerado también que el hongo puede ser reintegrado a su ambiente natural a través de los cadáveres de murciélagos infectados que caen en el guano acumulado en sus refugios (Taylor et al., 1999a; 2000a; 2005a; 2012a). Además, recientemente se ha revelado que la presencia de *H. capsulatum* en murciélagos puede arrojar nuevos datos epidemiológicos asociados a la diversidad genética del hongo aislado de estos mamíferos (González-González et al., 2011; 2012a Taylor et al., 2000a; 2005a; 2012a), así como aportar informaciones asociadas a la conducta migratoria y colonial de algunas especies de murciélagos, como ha sido sugerido por Taylor et al. (1999a; 2005a; 2012a).

Con base en la secuencia del marcador, como el único criterio aceptable para considerar una muestra infectada, en el presente estudio los porcentajes de infección por *H. capsulatum* en pulmón de murciélagos se calcularon tomando en cuenta sólo los resultados obtenidos con el marcador *Hcp100*, ya que la amplificación del marcador del antígeno M no arrojó datos confiables debido a la amplificación de varias bandas inespecíficas que al enviarlas a secuenciar no correspondieron al fragmento esperado del marcador. Sin embargo, el fragmento génico del antígeno M ha sido reportado como útil para identificar aislados de *H. capsulatum* (Ibarra-Camou et al., 2011; De Lima et al., 2012), pero su uso como marcador diagnóstico es cuestionable (Frias de León et al., 2012).

El alto porcentaje de infección con *H. capsulatum* detectado en pulmón de murciélagos, para los tres países de Latinoamérica en conjunto o en forma individual por país, puede

deberse a que tanto el método (PCR-anidada) como el marcador molecular (*Hcp100*) utilizados tienen alta sensibilidad (Muñoz et al., 2010) y favorecen la detección del patógeno en tejidos de su huésped, independientemente de la carga fúngica. Un parámetro que guarda una relación importante con los porcentajes de infección de los murciélagos estudiados es el tamaño de sus colonias, ya que las colonias con mayor número de ejemplares presentaron los más altos porcentajes de infección, como es el caso de los murciélagos de Tucumán, Argentina, que fueron capturados en un dique denominado Escaba, los cuales proceden de una de las colonias más grandes de *T. brasiliensis* de América del Sur que alberga más de cinco millones de individuos (http://www.guianoroeste.com.ar/ciudades.asp?id_ciudad=152&id_provincia=3).

En México, se observó un comportamiento similar con los murciélagos procedentes del estado de Nuevo León, que también alberga a millones de *T. brasiliensis* en una cueva denominada “La Boca”. El riesgo de infección de estos animales aumenta en proporción con el mayor acúmulo de guano que favorece el desarrollo del hongo.

Además, Taylor et al. (1999a) han documentado otros factores asociados al riesgo de los murciélagos para contraer la infección por *H. capsulatum*, como son las condiciones físicas de los refugios donde habita la colonia, representadas por: 1) la distancia techo-piso; 2) superficie del piso; y 3) la humedad y temperatura registradas.

Los resultados de la infección de murciélagos por *H. capsulatum* destacan la estrecha relación de este hongo con estos mamíferos en hábitats compartidos. Esta relación se ha dado posiblemente desde hace millones de años y su destino pudiera favorecer al hongo o promover una co-evolución entre ambos actores (Taylor et al., 2005a; 2012a; González-González, com. pers.).

Aunque el marcador *Hcp100* de *H. capsulatum* ha sido reportado como altamente sensible y específico (Muñoz et al., 2010), en el presente estudio se realizaron ensayos para probar su especificidad ya que González-González et al. (2012b), en un análisis de BLASTn de un fragmento de 156 nucleótidos del marcador *Hcp100* encontraron una similitud de 83% con la secuencia de un factor de transcripción de la cepa SLH14081 de *A. dermatitidis* (teleomorfo de *B. dermatitidis*) depositada en el GenBank. Asimismo, estos mismos autores en un análisis de BLASTx obtuvieron una identidad de 91% entre la secuencia de aminoácidos de un fragmento de la proteína p100 de *H. capsulatum* y el factor de transcripción de la cepa SLH14081 de *A. dermatitidis* reportada en el GenBank. En los ensayos de especificidad del marcador *Hcp100* realizados en el presente estudio, el DNA de *B. dermatitidis* amplificó la banda de 210 pb del marcador,

lo que puede explicarse debido a la estrecha relación filogenética entre estos dos hongos que pertenecen a la misma familia y al mismo género teleomorfo (*Ajellomyces*). Los resultados alcanzados en este trabajo revelaron un porcentaje de similitud de 86% para la secuencia de nucleótidos y de 91% de identidad con un fragmento de la proteína p100 de *H. capsulatum* y de 100% de identidad con el fragmento de un factor de transcripción de *A. dermatitidis* (GenBank), datos que sugieren que se trate de la misma proteína codificada por genes ortólogos. Estos resultados derivados de los ensayos de PCR fueron similares a los reportados por González-González et al. (2012b).

Debido a que *H. capsulatum* y *B. dermatitidis*, poseen una alta similitud en las secuencias del marcador *Hcp100*, la interpretación de los resultados de diagnóstico molecular empleando este marcador deben ser tomada con reserva en zonas endémicas compartidas para histoplasmosis y blastomicosis, como ocurre en los Estados Unidos. Además, tanto *H. capsulatum* como *B. dermatitidis* infectan al huésped por vía respiratoria y diseminan a otros órganos, generando una nosología parecida. Como lo hemos señalado a lo largo del presente trabajo, la obtención de la secuencia del producto amplificado es importante para descartar posibles amplificaciones no específicas y las diferencias sutiles, entre las secuencias de agentes etiológicos de áreas endémicas compartidas, pueden constituirse en el estándar de oro para definir la etiología de la enfermedad.

Sin embargo, resultados recientes reportados por Muñoz et al. (2010), a diferencia de lo encontrado en este estudio no observaron la amplificación del DNA de *B. dermatitidis* con los oligonucleótidos del marcador *Hcp100*. En los hallazgos del presente trabajo la contaminación de la PCR está descartada por la secuencia de *B. dermatitidis* obtenida y los análisis realizados. Coincidimos con los resultados de Muñoz et al. (2010) en lo referente a que los DNAs de otros hongos heterólogos no amplifican el marcador.

A pesar de la amplificación del DNA de *B. dermatitidis*, el marcador *Hcp100* sigue siendo una herramienta útil para la detección de *H. capsulatum* en tejidos de huéspedes infectados como ha sido demostrado en diversos trabajos para el diagnóstico y la epidemiología de la histoplasmosis (Bialek et al., 2002; Espinosa-Avilés et al., 2008; Maubon et al., 2007; Muñoz et al., 2010; Reyes-Montes et al., 2009; Taylor et al., 2005a). Sin embargo, el presente estudio recomienda la necesidad de la obtención de la secuencia del fragmento amplificado del marcador *Hcp100*.

Aunque el órgano blanco primario para *H. capsulatum* es el pulmón, este hongo tiene la capacidad de diseminarse hacia otros órganos ya que es un parásito del sistema

fagocítico mononuclear. La diseminación del hongo se realiza con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos (Kauffman, 2007). Para comprobar la posible diseminación de *H. capsulatum* a otros órganos de los murciélagos estudiados, se realizaron ensayos para el marcador *Hcp100* en muestras de DNA de bazo de los murciélagos que amplificaron previamente el marcador *Hcp100* en pulmón. Los porcentajes de detección de la presencia de *H. capsulatum* en bazo variaron en un rango de 60 a más de 90%, sugiriendo un alto porcentaje de diseminación. Ésto, puede deberse a que la mayoría de los murciélagos estudiados en este trabajo habitaban cuevas, muchas de las cuales con colonias de millones de individuos como es el caso para *T. brasiliensis*. La característica común de estos hábitats es el gran acúmulo de guano y, por consiguiente, la alta concentración de propágulos fúngicos infectivos. Sin embargo, los porcentajes de diseminación encontrados no se relacionaron con la especie, tipo de alimentación, distribución geográfica o tamaño de la colonia de los murciélagos estudiados. Taylor et al. (1999a) reportó la diseminación de *H. capsulatum* a hígado, bazo e intestino de murciélagos silvestres obtenidos mediante el aislamiento del hongo, y al examen microscópico del tejido de estos órganos no se observó la reacción inflamatoria característica de la histoplasmosis, aunque se encontraron estructuras compatibles con levaduras intracelulares de *H. capsulatum* en macrófagos alveolares.

Los microorganismos pertenecientes al género *Pneumocystis* tienen un alta especificidad por su huésped y se encuentran bien adaptados para sobrevivir en los pulmones de mamíferos terrestres y acuáticos (Aliouat-Denis et al., 2008). Con base en sus características genotípicas y fenotípicas, múltiples especies de *Pneumocystis* han sido reconocidas (Cushion et al., 2004; Dei-Cas, 2000; Dei-Cas et al., 2006; Frenkel, 1999; Keely et al., 2004; Stringer et al., 2001). Datos genéticos e isoenzimáticos, en este grupo heterogéneo de hongos microscópicos estrechamente relacionados entre sí, sugieren que la especiación en el género *Pneumocystis* resultó de un largo aislamiento genético y con una co-evolución en paralelo con las especies de sus huéspedes mamíferos (Dei-Cas, 2000; Dei-Cas et al., 1998; 2006; Demanche et al., 2001; 2003; Guillot et al., 2001; Hugot et al., 2003; Keely et al., 2003; Mazars et al., 1997).

El análisis de los loci de los genes del RNA ribosomal y de la DHFR mostró que *P. carinii* y *P. jirovecii* divergieron hace alrededor de 90-100 millones de años (Keely et al., 2003), sugiriendo que los microorganismos que comprenden este género se encuentran relacionados a sus huéspedes mamíferos desde hace mucho tiempo.

Derouiche et al. (2009) reportan la asociación entre murciélagos y *Pneumocystis* sp. al utilizar a este patógeno fúngico como marcador filogeográfico de los murciélagos. Esta característica del patógeno sólo se presenta en los organismos que poseen una estrecha relación con su huésped.

Aunque es asociado a individuos inmunocomprometidos, descubrimientos recientes han permitido establecer que *Pneumocystis* es capaz de colonizar de forma benigna el huésped y ser transmitido de un huésped inmunocompetente, que sirve como reservorio, a un individuo susceptible inmunocomprometido (Calderón et al., 1996, 2004; Dei-Cas, 2000; Peterson y Cushion, 2005; Vargas et al., 2005).

En este estudio, el porcentaje total de infección con *Pneumocystis* sp. en murciélagos silvestres para los tres países de Latinoamérica fue de 38.5% y, por país, los resultados variaron considerablemente desde 23.5% para los murciélagos capturados en Guerrero, México, hasta 75.8% para los individuos procedentes del Nuevo León, México.

Los porcentajes de infección por *Pneumocystis* sp. aunque menores a los obtenidos para *H. capsulatum*, fueron importantes y permitieron confirmar la presencia de este patógeno fúngico en los pulmones de murciélagos silvestres. Estos datos pueden ser explicados por el hecho de que *Pneumocystis* sp. no sólo se encuentra en huéspedes inmunosuprimidos, como sería de esperarse por su característica oportunista, sino que *Pneumocystis* sp. también podría multiplicarse transitoriamente en pulmones de individuos inmunocompetentes, y convertir a este tipo de huéspedes como sus reservorios y dispersores, además de sus transmisores de individuo a individuo como lo ha sugerido Chabé et al. (2004) en colonias de roedores. Como los murciélagos son animales sociales que acostumbran acicalarse entre miembros de la misma especie, este comportamiento facilitaría la transmisión directa de *Pneumocystis* sp. en su población. Los porcentajes de infección para las grandes colonias de murciélagos capturados en Nuevo León, México y en Tucumán, Argentina fueron los más altos, lo que implica que el tamaño de la colonia es un factor importante para la transmisión de este patógeno, como ocurrió para la infección por *H. capsulatum*.

La co-infección de distintas especies de patógenos en un mismo huésped puede ser más común de lo que se cree y, en particular, los animales silvestres son más propensos a portar al mismo tiempo más de un patógeno de diferentes grupos taxonómicos (Dei-Cas com. pers.). Este tipo de interacción que se lleva a cabo entre diferentes especies de parásitos y un mismo huésped, incluye una gama de relaciones directas e indirectas entre los agentes etiológicos participantes de la co-infección. Estas relaciones pueden

ser positivas, donde el establecimiento de un parásito favorecería la entrada y sobrevivencia del otro; mientras que en las relaciones negativas el establecimiento de un parásito evitaría la entrada o disminuiría la posibilidad de sobrevivencia de otro parásito (Krasnov et al., 2005). Las relaciones positivas entre varias especies de parásitos en un mismo huésped puede ser influenciada por el estado inmunológico del huésped, el cual puede ser vulnerable a múltiples desafíos por otras especies de parásitos (Krasnov et al., 2005).

Pneumocystis sp. e *H. capsulatum* a pesar de compartir el órgano blanco primario y producir un cuadro neumónico similar tienen distintas interacciones con el huésped. *Pneumocystis* es primordialmente un patógeno extracelular y se une a los neumocitos tipo I sin invadirlos, salvo en ocasiones donde los filopodios de sus trofozoitos penetran a la célula huésped, mientras que *H. capsulatum* es preferencialmente un patógeno intracelular de fagocitos profesionales y no profesionales y, ocasionalmente, cuando la célula huésped es lisada su forma parasitaria levaduriforme se encuentra extracelularmente en los tejidos circundantes.

Los porcentajes obtenidos de co-infección por *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. en murciélagos silvestres, aunque menores al 50%, revelan que la co-infección por estos patógenos fúngicos en poblaciones de estos mamíferos es importante y debe ser estudiada con más detalles para conocer mejor el papel que juegan cada uno de los actores involucrados, incluyendo el huésped, en estas interacciones interespecíficas. Un parámetro primordial asociado a los resultados encontrados en este trabajo y que facilitó la co-infección fue el tamaño de la colonia de los murciélagos, donde las colonias más grandes procedentes de Nuevo León, México, y de Tucumán, Argentina fueron dos de las que presentaron los porcentajes más altos de co-infección, junto con la colonia de murciélagos procedente del estado Morelos, México.

Un aspecto a considerar en la infección por *Pneumocystis* es el hecho de que ésta induce alteraciones en las propiedades físicas de las proteínas surfactantes pulmonares alterando sus funciones (Atochina et al., 2000). Además, en la neumocistosis se ha propuesto que la proteína surfactante SP-A (colectina) tiene un papel importante en la eliminación de *Pneumocystis* sp. mientras que la colectina SP-D es irrelevante para la eliminación del patógeno. Mientras que en la respuesta inmune innata contra la histoplasmosis, las proteínas surfactantes SP-A y SP-D son fundamentales en la defensa del tejido pulmonar contra el establecimiento de la infección por *H. capsulatum* (Brummer et al., 2010). A la fecha, no sabemos si las alteraciones producidas por

Pneumocystis sp. en las propiedades físicas de las proteínas surfactantes pulmonares podrían favorecer la implantación de *H. capsulatum* en pulmón. En la literatura científica existen ejemplos de como el establecimiento de un primer patógeno promueve la implantación de un segundo patógeno (Christodoulou et al., 2011). Así, la relación *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. en interacción con un huésped susceptible queda abierta a una investigación futura.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que tanto *H. capsulatum* como *Pneumocystis* sp. son microorganismos que se encuentran circulando en poblaciones de murciélagos, no importando la región geográfica de la que provengan. Este estudio también resalta la estrecha relación que existe entre los murciélagos y los patógenos fúngicos *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp., contribuyendo al conocimiento de las infecciones individuales de cada patógeno y de la co-infección entre ambos. En el caso de *H. capsulatum*, los datos reportados contribuyen a una mejor comprensión de la epidemiología de la histoplasmosis al registrar la distribución de fuentes de infección de este hongo relacionado a hábitats de murciélagos localizados en refugios donde existe alta posibilidad de infección con *H. capsulatum* tanto en México como en otros países de Latinoamérica.

Este tipo de estudios abre las puertas para la investigación de las relaciones interespecíficas que se producen entre patógenos dentro de un mismo huésped y, así, entender el papel que juega cada uno de los actores involucrados (patógenos y huésped) en estas interacciones. Por parte de los patógenos, es importante saber los mecanismos que favorecen el establecimiento de un patógeno y que repercute en la posterior infección de otro patógeno. Mientras que, por parte del huésped, es fundamental conocer los factores asociados (inmunológicos y genéticos) a la susceptibilidad o resistencia a la co-infección fúngica.

CONCLUSIONES

Los altos porcentajes de infección obtenidos demuestran que *H. capsulatum* tiene una estrecha relación con los murciélagos, los cuales pueden servir como reservorios y dispersores de este hongo en el ambiente.

Los hábitos alimenticios, la especie así como la distribución geográfica de los murciélagos no influyeron en la infección por *H. capsulatum*.

El único patrón conductual que presentó una relación con la infección por *H. capsulatum* fue el tamaño de la colonia.

El marcador *Hcp100* de *H. capsulatum*, a pesar de que amplificó DNA de *B. dermatitidis*, es una herramienta útil que debe ser considerada para diagnóstico molecular de la histoplasmosis.

Los porcentajes de infección por *Pneumocystis* sp. revelaron que este patógeno se encuentra circulando en poblaciones de murciélagos silvestres.

No se encontró relación entre el porcentaje de infección por *Pneumocystis* sp. y los hábitos alimenticios, la especie, así como la distribución geográfica de los murciélagos.

El único patrón conductual que presentó una relación con la infección por *Pneumocystis* sp. fue el tamaño de la colonia.

Los marcadores *mtLSUrRNA* y *mtSSUrRNA* de *Pneumocystis* sp. fueron altamente específicos y sensibles para detectar este patógeno fúngico en tejidos del huésped.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar la co-infección por *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. en murciélagos silvestres, en porcentajes importantes.

PERSPECTIVA

La continuidad de los estudios de co-infección por *H. capsulatum* y *Pneumocystis* sp. permitirá conocer el papel que juegan los distintos actores involucrados (los parásitos y el huésped) en el establecimiento de la infección y desarrollo de las enfermedades asociadas a estos parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Pequeño E. 1959. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bat guano in caves of the northeast of Mexico. Gac. Méd. Méx. 89: 243–257.

Akbar H, Pincon C, Aliouat C, Derouiche S, Taylor ML, Pottier M, Carreto-Binaghi LH, Gonzalez-Gonzalez AE, Courpon A, Barriol V, Guillot J, Chabe M, Suarez-Alvarez R, Aliouat EM, Dei-Cas E, Demanche C. 2012. Characterizing *Pneumocystis* in the lungs of bats: understanding *Pneumocystis* evolution and spread of *Pneumocystis* organisms in mammal populations. Appl. Environ. Microbiol. (Enviado).

Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, Dei-Cas E. 2008. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. Infect. Genetic. Evol. 8: 708-726.

Anderson H, Honish L, Taylor G, Johnson M, Tovstik C, Fanning A, Tyrrell G, Rennie R, Jaipaul J, Sand C, Probert S. 2006. Histoplasmosis cluster, golf course, Canada. Emerg. Infect. Dis. 12: 163-165.

Anthony ELP. 1988. Age determination in bats. In: Kunz TH, ed. *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, pp. 47–58.

Atochina EN, Beers MF, Scanlon ST, Preston AM, Beck JM. 2000. *P. carinii* induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278: L599-L609.

Barton EG, Campbell WG. 1967. Further observations on the ultrastructure of *Pneumocystis*. Arch. Pathol. 83: 527–534.

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling 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: 1644-1647.

- Brummer E, Stevens DA. 2010. Collectins and fungal pathogens: roles of surfactant proteins and mannose binding lectin in host resistance. *Med. Mycol.* 48: 16-28.
- Bryles MC, Cozad GC, Robinson A. 1969. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in Oklahoma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 399–400.
- Cailliez JC, Séguy N, Denis CM, Aliouat EM, Mazars E, Polonelli L, Camus D, Dei-Cas E. 1996. *Pneumocystis carinii*: an atypical fungal microorganism. *J. Med. Vet. Mycol.* 34: 227-239.
- Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. 1996. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet* 347: 977.
- Calderón EJ, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, Gonzales-Becerra C, Respaldiza N, De La Horra C, Montes-Cano MA, Vigil E, Gonzales de la Puente MA, Cuello JA. 2004. Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 673–676.
- Callebaut I, Mornon JP. 1997. The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochem. J.* 321: 125-132.
- Campbell WG. 1972. Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lungs: life cycle of human pneumocystosis. *Arch. Pathol.* 93: 312–324.
- Carini A. 1910. Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. *Bol. Soc. Med. Cir. Sao Paulo* 18: 204.
- Ceballos G, Oliva G. 2005. *Los Mamíferos Silvestres de México*. México DF: FCE-CONABIO.
- Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I. 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 89–97.

Chagas C. 1909. Nova tripanozomiazaea humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159–218.

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. Nal. Enf. Resp. Mex. 11: 187-191.

Christodoulou V, Messaritakis I, Svirinaki E, Tsatsanis C, Antoniou M. 2011. *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii*: Mixed infection of macrophages *in vitro* and *in vivo*. Exp. Parasitol. 128: 279–284.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. Med. Mycol. DOI: 10.3109/13693786.2011.577821.

Colonna-Romano S, Porta A, Franco A, Kobayashi GS, Maresca B. 1998. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during macrophages infection. Microb. Pathog. 25: 55-66.

Constantine DG. 1988. Health precautions for bat researches. In: Kunz TH, ed. Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats. Washington DC: Smithsonian Institution Press, pp. 491-528.

Cox FEG. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. Parasitology 122: S23-S38.

Cushion M, Keely S, Stringer J. 2004. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. Mycologia 96: 429–438.

Cushion MT, Smulian AG. 2006. *Pneumocystis*. J. Eukariot. Microbiol. 53: S80-S84.

- De Lima IS, Lima AKF, Morishi MO, Salem JI, Braga De Souza JV. 2012. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 29: 34–39.
- Deepe GS Jr. 1994. The immune response to *Histoplasma capsulatum*: unearthing its secrets. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 201–205.
- Deepe GS Jr, Durose GG. 1995. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 63: 3151–3157.
- Dei-Cas E. 2000. *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med. Mycol.* 38: 23–32.
- Dei-Cas E, Chabé M, Durand-Joly I, Aliouat CM, Aliouat EM. 2010. *Pneumocystis* y pneumocistosis En: Méndez-Tovar LJ, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, eds. *Actualidades en Micología Médica, Contenido Temático del VIII Diplomado en Micología Médica “Dr. Teófilo Herrera”*. México DF: Facultad de Medicina, UNAM, pp. 289-297.
- Dei-Cas E, Chabé M, Moukhlis R, Durand-Joly I, Aliouat EM, Stringer JR, Cushion MT, Noel C, Sybren de Hoog G, Guillot J, Viscogliosi E. 2006. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. *FEMS Microbiol. Rev.* 80: 853–871.
- Dei-Cas E, Mazars E, Aliouat EM, Nevez G, Cailliez JC, Camus D. 1998. The host-specificity of *Pneumocystis carinii*. *J. Mycologie Médicale* 8: 1–6.
- Delanoë P, Delanoë M. 1912. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 155: 658-660.
- Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, Guillot J. 2001. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests co-evolution. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2126–2133.

Demanche C, Petit T, Moisson P, Ollivet F, Rigoulet J, Chermette R, Dei-Cas E, Wakefield AE, Guillot J. 2003. Assessment of *Pneumocystis* species carriage in captive primates. *Vet. Rec.* 152: 811–813.

Derouiche S, Deville M, Taylor ML, Akbar H, Guillot J, Carreto-Binaghi LE, Pottier M, Aliouat EM, Aliouat-Denis CM, Dei-Cas E, Demanche C. 2009. *Pneumocystis* diversity as a phylogeographic tool. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 112-117.

DiSalvo AF, Ajello L, Palmer JW Jr, Winkler WG. 1969. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *Am. J. Epidemiol.* 89: 606–614.

Domer JE. 1971. Monosaccharide and chitin content of cell walls of *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Bacteriol.* 107: 870-877.

Domer JE, Hamilton JG, Harkin JC. 1967. Comparative study of the cell walls of the yeast-like and mycelial phases of *Histoplasma capsulatum*. *J. Bacteriol.* 94: 466-474.

Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA, Prah GN, Smith JW. 1992. The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol. Microbiol.* 6: 3365-3373.

Edman JC, Edman U, Cao M, Lundgren B, Kovacs JA, Santi DV. 1989a. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8625-8629.

Edman U, Edman JC, Lundgren B, Santi DV. 1989b. Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6503-6507.

Emmons CW. 1949. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Rep.* 64: 892–896.

Emmons CW. 1958. Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Rep.* 73: 590–595.

Emmons CW, Klite PD, Baer GM, Hill WB Jr. 1966. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the United States. Am. J. Epidemiol. 84: 103–109.

Eriksson OE, Winka K. 1997. Supraordinal taxa of the Ascomycota. Myconet 1: 1-16.

Espinosa-Avilés D, Taylor ML, Reyes-Montes MR, Pérez-Torres A. 2008. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). J. Zoo Wildl. Med. 39: 450-454.

Estrada-Bárceñas D. 2010. *Interacción entre el Hongo Patógeno de Mamíferos Histoplasma capsulatum var. capsulatum y Artrópodos de su Hábitat en Cavernas: Estudios Asociados a la Biología de la Interacción y la Diversidad Genética del Hongo*. Tesis de doctorado, Posgrado en Ciencias Biológicas, México DF: Facultad de Ciencias, UNAM.

Frenkel JK. 1999. *Pneumocystis pneumonia*, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. J. Eukaryot. Microbiol. 46: S89–S92.

Frías De León MG, Arenas-López G, Taylor ML, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MR. 2012. Development of specific sequence characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. J. Clin. Microbiol. 50: 3673-3679.

González-González AE, Aliouat-Denis CM, Carreto-Binaghi LE, Ramírez JA, Rodríguez-Arellanes G, Demanche C, Chabé M, Aliouat EM, Dei-Cas E, Taylor ML. 2011. An *Hcp100* gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats. Epidemiol. Infect. doi:10.1017/S0950268811002585.

González-González AE, Ramírez JA, Aliouat-Denis CM, Demanche C, Aliouat EM, Dei-Cas E, Chabé M, Taylor ML. 2012a. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* in the lung of a free-ranging common noctule (*Nyctalus noctula*) from France, using the *Hcp100* gene. J. Zoo Wildl. Med. (Enviado).

González-González AE, Taylor ML, Curiel-Quesada E. 2012b. Aspectos relevantes del marcador molecular *Hcp100* de *Histoplasma capsulatum* y su potencial uso terapéutico en la histoplasmosis. Rev. Iberoam. Micol. (In press).

González-Ochoa A. 1963. Relationships among bat habitat and *Histoplasma capsulatum*. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 23: 81-86.

Gorocica P, Taylor ML, Alvarado-Vasquez N, Pérez-Torres A, Lascurain R, Zenteno E. 2009. Interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: its relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104: 492-496.

Guedes HL, Guimaraes AJ, Muniz MM, 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.

Guillot J, Demanche C, Hugot JP, Berthelemy M, Wakefield AE, Dei-Cas E, Chermette R. 2001. Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species and their mammalian hosts. J. Eukaryot. Microbiol. 47: S113-S115.

Guimaraes AJ, Hamilton AJ, de M Guedes HL, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. 2008. Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. PLoS ONE 3: 1-17.

Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. 2006. Diagnosis of histoplasmosis. Braz. J. Microbiol. 37: 1-13.

Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Mohan A, Agarwal SK, Kumar L, Kabra SK, Samantaray JC. 2007. Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* infection in a tertiary care reference hospital in India. Scand. J. Infect. Dis. 39: 571-576.

Hall ER. 1981. *The Mammals of North America*. New York: John Wiley and Sons.

Hamilton AJ, Bartholomew MA, Figueroa J, Fenelon LE, Hay RJ. 1990. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross reactivity with other dimorphic fungi. *J. Med. Vet. Mycol.* 28: 479-485.

Handley CO. 1988. Specimen preparation. In: Kunz TH, ed. *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, pp. 437-457.

Haque AU, Plattner SB, Cook RT, Hart MN. 1987. *Pneumocystis carinii*: taxonomy as viewed by electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.* 87: 504-510.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.

Hoff GL, Bigler WJ. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J. Wildl. Dis.* 17: 191-196.

Huang SN, Fischer SH, Shaugnessy E, Gill VJ, Masur H, Kovacs JA. 1999. Development of a PCR assay for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia based on amplification of multicopy major surface glycoprotein gene family. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 35: 27-32.

Hugot JP, Demanche C, Barriel V, Dei-Cas E, Guillot J. 2003. Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear DNA sequence comparison. *Syst. Biol.* 52: 735-744.

Ibarra-Camou B, Toranzo AI, Lee W, Davel G, Canteros CE. 2011. Identificación rápida de *Histoplasma capsulatum* en lisados de cultivo. Rev. Iberoam. Micol. 28: 26–31.

Index Fungorum. 2008. <http://data.gbif.org/search/Histoplasma%20capsulatum>.

Ito M, Nozu R, Kuramochi T, Eguchi N, Suzuki S, Hioki K, Itoh T, Ikeda F. 2000. Prophylactic effect of FK463, a novel antifungal lipopeptide, against *Pneumocystis carinii* infection in mice. Antimicrob. Agents Chemoter. 44: 2259-2262.

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443: 818-822.

Johnson CH, Klotz MG, York JL, Krufft V, McEwen JE. 2002. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. Microbiology 148: 1129-1142.

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.

- Kauffman CA. 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* 20: 115-132.
- Kauffman L, Blumer S. 1966. Occurrence of serotypes among *Histoplasma capsulatum* strains. *J. Bacteriol.* 91: 1434-1439.
- Keely SP, Fischer JM, Cushion MT, Stringer JR. 2004. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology* 150: 1153-1165.
- Keely SP, Fischer JM, Stringer JR. 2003. Evolution and speciation of *Pneumocystis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50: S624-S626.
- Krasnov BR, Mouillot D, Khokhlova IS, Shenbrot GI, Poulin R. 2005. Covariance in species diversity and facilitation among non-interactive parasite taxa: all against the host. *Parasitology* 131: 557-568.
- Kwong-Chung KJ, Bennett JE. 1992. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. 1995. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2785–2788.
- Matsumoto Y, Yoshida Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J. Protozool.* 31: 420–428.
- Maubon D, Simon S, Aznar C. 2007. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 441-444.
- Mazars E, Guyot K, Durand I, Dei-Cas E, Boucher S, Ben Abderrazak S, Banuls AL, Tibayrenc M, Camus D. 1997. Isoenzyme diversity in *Pneumocystis carinii* from rats, mice and rabbits. *J. Infect. Dis.* 175: 655-660.

Meade JC, Stringer JR. 1991. PCR amplification of DNA sequences from the transcription factor IID and cation transporting ATPase genes in *Pneumocystis carinii*. J. Protozool. 38: S66-S68.

Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, Muskus C, Cano LE, González A. 2010. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. Clin. Vaccine Immunol. 17: 62-67.

Nishida H, Sugiyama J. 1993. Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and the other fungi. Mol. Biol. Evol. 12: 883-886.

Olsson M, Elvin K, Lidman C, Löfdahl S, Linder E. 1996. A rapid and simple nested PCR assay for the detection of *Pneumocystis carinii* in sputum samples. Scand. J. Infect. Dis. 28: 597-600.

Palluault F, Slommianny C, Soulez B, Dei-Cas E, Camus D. 1992. High osmotic pressure enables fine ultrastructural and cytochemical studies on *Pneumocystis carinii*. I: Epon embedding. Parasitol. Res. 78: 437-444.

Peterson JC, Cushion MT. 2005. *Pneumocystis*: not just pneumonia. Curr. Opin. Microbiol. 8: 393-398.

Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. 1991. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. Mol. Microbiol. 5: 1347-1351.

Ponting CP. 1997. Tudor domains in proteins that interact with RNA. TIBS 22: 51-52.

Porta A, Colonna-Romano S, Callebaut I, Franco A, Marzullo L, Kobayashi GS, Maresca B. 1999. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 254: 605-613.

Powles MA, Liberator P, Anderson J, Karkhanis Y, Dropinski JF, Bouffard FA, Balkovec JM, Fujioka H, Aikawa M, Mcfadden D, Schmatz D. 1998. Efficacy of MK-991 (L-743.872) a semisynthetic pneumocandin, in murine models of *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 42: 1985-1989.

Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Parás-García A, Juan-Sallés C, Taylor ML. 2009. Identification of histoplasmosis infection source from two captive maras (*Dolichotis patagonum*) of the same colony by using molecular and immunologic assays. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 102-104.

Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 183-184.

Stringer JR, Cushion MT, Wakefield AE. 2001. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J. Eukaryot. Microbiol. Suppl.* 184S-189S.

Stringer SL, Hudson K, Blasé MA, Walzer PD, Cushion MT, Stringer JR. 1989. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J. Protozool.* 36: S14-S16.

Sugiyama J, Hosaka K, Suh SO. 2006. Early diverging Ascomycota: phylogenetic divergence and related evolutionary enigmas. *Mycologia* 298: 996-1005.

Sündstrom JF, Vaculova A, Smertenko AP, Savenko EI, Golovko A, Minina E, Tiwari BS, Rodriguez-Nieto S, Zamyatin Jr AA, Välineva T, Saarikettu J, Frilander MJ, Suarez MF, Zavialov A, Ståhl U, Hussey PJ, Silvennoinen O, Sundberg E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV. 2009. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionary conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat. Cell Biol.* 11: 1347-1354.

Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, Marinaci S, Zinzi D, Margutti P, Ortona E, Siracusano A. 1998. Potential impact of *Pneumocystis* genetic diversity on the molecular detection of the parasite in human host. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 22: 37-49.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. 2000a. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet. Biol.* 30: 207-212.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Rojas-Martínez A, Reyes-Montes MR, Bobadilla Del Valle M, Zuñiga G. 2005a. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45: 451-458.

Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Vargas-Yañez R, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Toriello C, Pérez A, Reyes-Montes MR. 1999a. Environmental conditions favoring bat infections with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 914-919.

Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. 1999b. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 126-146.

Taylor ML, Granados J, Toriello C. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the state of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 39: 375-379.

Taylor ML, Hernández-García L, Estrada-Bárceñas D, Salas-Lizana R, Zancopé-Oliveira RM, García De La Cruz S, Galvão-Dias MA, Curiel-Quesada E, Canteros CE, Bojórquez-Torres G, Bogard-Fuentes CA, Zamora-Tehozol E. 2012a. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions. *Fungal Biol.* 116: 308-317.

Taylor ML, Pérez-Torres A, Zenteno E, Ramírez JA, Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, González-González AE, Sahaza JH. 2012b. Histoplasmosis: Aspectos relevantes de la patogénesis y del diagnóstico. En: Pérez-Campos J, ed. *Tópicos Selectos de Patología Clínica*. 2a. ed., México DF: UABJO-UNAM (Enviado).

Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, Curiel-Quesada E, Duarte-Escalante E, Rodríguez-Arellanes G, Peña-Sandoval GR, Valenzuela-Tovar F. 2000b. Ecology and

molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum* in Mexico. In: Benedit M, ed. *Research Advances in Microbiology*. Kerala: Global Research Network, pp. 29-35.

Taylor ML, Reyes-Montes MR, González-G R, Casasola J, Hernández-Ramírez A. 1982. Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to *Histoplasma* infection. In: Baxter M, ed. *Proceedings VIII Congress of ISHAM*. Palmerston North: Massey University Press, pp. 260-264.

Taylor ML, Rodríguez-Arellanes G, Ramírez JA, González-González AE, Sahaza JH, Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas DA. 2012c. Características relevantes de *Histoplasma capsulatum* y de la epidemiología molecular de la histoplasmosis. En: *Actualidades en Micología Médica, Contenido Temático del IX Diplomado en Micología Médica*. México DF. (Enviado).

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

Tesh RB, Schneidau JD Jr. 1967. Naturally occurring histoplasmosis among bat colonies in the Southeastern United States. *Am. J. Epidemiol.* 86: 541-551.

Tewari RP, Berkhout FJ. 1972. Comparative pathogenicity of albino and brown types of *Histoplasma capsulatum* for mice. *J. Infect. Dis.* 125: 504-508.

Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. 1998. Agents of histoplasmosis. In: Ajello L, Hay RJ, eds. *Medical Mycology. Topley and Wilson's, Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed. New York: Arnold and Oxford University Press, pp. 373-407.

Toranzo AI, Tirabochi IN, Fernández N, Ibarra-Camou B, Rivas MC, Lee W, Davel G, Canteros CE. 2009. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 20-26.

- Totet A, Pautard JC, Raccurt C, Roux P, Nevez G. 2003. Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jirovecii* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1173-1180.
- Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. 1998. Pre-AIDS isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotypic similarity with contemporary isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 90-93.
- Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE. 1999. Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Med. Microbiol.* 48: 897-905.
- Utili R, Durante-Mangoni E, Basilico C, Mattei A, Ragone E, Grossi P. 2007. Efficacy of caspofungin addition to trimethoprim-sulfamethoxazole treatment for severe pneumocystis pneumonia in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 84: 685-688.
- Vargas SL, Ponce CA, Luchsinger V, Silva C, Gallo M, López R, Belletti J, Velozo L, Avila R, Palomino MA, Benveniste S, Avendaño LF. 2005. Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *J. Infect. Dis.* 191: 122-126.
- Vavra J, Kucera K. 1970. *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J. Protozool.* 17: 463-483.
- Velasco-Castrejón O. 1998. La histoplasmosis pulmonar primaria en México. *Rev. Inst. Nal. Enf. Res. Mex.* 11: 221-225.
- Wakefield AE. 1996. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1754-1759.
- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, Hopkin JM. 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 336: 451-453.
- Wheat J. 1995. Endemic mycoses in AIDS: a clinical review. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 146-159.

Wilson DE, Reeder DAM. 1993. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. Washington DC: Smithsonian Institution Press.

Woods JP. 2002. *Histoplasma capsulatum* molecular, genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet. Biol.* 35: 81-97.

Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. 1992. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect. Immun.* 60: 4140-4145.

Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe GS Jr. 1999. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 67: 1947-1953.

Anexo 1. Lista de muestras con secuencias no publicadas del marcador *Hcp100* y depositadas en el GenBank, obtenidas de pulmón de murciélagos infectados con *H. capsulatum*.

Muestra	No. de acceso del GenBank
M-420P	JX091346
M-421P	JX091347
M-422P	JX091348
M-425P	JX091349
M-426P	JX091350
M-466P	JX091351
M-467P	JX091352
M-526P	JX091353
M-527P	JX091354
M-528P	JX091355
M-529P	JX091356
M-530P	JX091357
M-531P	JX091358
M-535P	JX091359
M-536P	JX091360
M-537P	JX091361
M-538P	JX091362
M-539P	JX091363
M-540P	JX091364
M-541P	JX091365
M-542P	JX091366
G-8P	JX091367
G-12P	JX091368
G-13P	JX091369
G-18P	JX091370

Anexo 2. Lista de muestras con secuencias no publicadas del marcador *Hcp100* y depositadas en el GenBank, obtenidas de bazo de murciélagos infectados con *H. capsulatum*

Muestra	No. de acceso del GenBank	Muestra	No. de acceso del GenBank
M-421B	JX138902	M-507B	JX138933
M-422B	JX138903	M-510B	JX138934
M-425B	JX138904	M-511B	JX138935
M-426B	JX138905	M-512B	JX138936
M-444B	JX138906	M-513B	JX138937
M-445B	JX138907	M-514B	JX138938
M-446B	JX138908	M-515B	JX138939
M-447B	JX138909	M-516B	JX138940
M-450B	JX138910	M-517B	JX138941
M-453B	JX138911	M-518B	JX138942
M-454B	JX138912	M-519B	JX138943
M-455B	JX138913	M-520B	JX138944
M-456B	JX138914	M-521B	JX138945
M-458B	JX138915	M-522B	JX138946
M-459B	JX138916	M-523B	JX138947
M-460B	JX138917	M-524B	JX138948
M-468B	JX138918	M-525B	JX138949
M-470B	JX138919	M-526B	JX138950
M-471B	JX138920	M-527B	JX138951
M-473B	JX138921	M-528B	JX138952
M-474B	JX138922	M-529B	JX138953
M-476B	JX138923	M-530B	JX138954
M-478B	JX138924	M-531B	JX138955
M-480B	JX138925	M-535B	JX138956
M-481B	JX138926	M-536B	JX138957
M-483B	JX138927	M-538B	JX138958
M-484B	JX138928	M-539B	JX138959
M-485B	JX138929	M-541B	JX138960
M-487B	JX138930	M-542B	JX138961
M-501B	JX138931	M-AR01	JX138962
M-506B	JX138932	M-AR03	JX138963

**ARTÍCULOS RELACIONADOS A LA TESIS: PUBLICADOS Y ENVIADOS A
PUBLICACIÓN**

An *Hcp100* gene fragment reveals *Histoplasma capsulatum* presence in lungs of *Tadarida brasiliensis* migratory bats

A. E. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ¹, C. M. ALIOUAT-DENIS^{2,3},
L. E. CARRETO-BINAGHI¹, J. A. RAMÍREZ¹, G. RODRÍGUEZ-ARELLANES¹,
C. DEMANCHE^{2,3}, M. CHABÉ^{2,3}, E. M. ALIOUAT², E. DEI-CAS^{3,4}
AND M. L. TAYLOR^{1*}

¹ Department of Microbiology-Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico DF, Mexico

² Department of Parasitology-Myecology, Faculty of Biological and Pharmaceutical Sciences, University of Lille-Nord-de France, France

³ Biology and Diversity of Emergent Eukaryotic Pathogens (BDEEP), Centre for Infection and Immunity of Lille, Pasteur Institute of Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, France

⁴ Department of Parasitology-Myecology, Faculty of Medicine, University of Lille-Nord-de France, Biology-Pathology Centre, University Hospital Centre, Lille, France

(Accepted 9 November 2011)

SUMMARY

Histoplasma capsulatum was sampled in lungs from 87 migratory *Tadarida brasiliensis* bats captured in Mexico ($n=66$) and Argentina ($n=21$). The fungus was screened by nested-PCR using a sensitive and specific *Hcp100* gene fragment. This molecular marker was detected in 81·6% [95% confidence interval (CI) 73·4–89·7] of all bats, representing 71 amplified bat lung DNA samples. Data showed a *T. brasiliensis* infection rate of 78·8% (95% CI 68·9–88·7) in bats captured in Mexico and of 90·4% (95% CI 75·2–100) in those captured in Argentina. Similarity with the *H. capsulatum* sequence of a reference strain (G-217B) was observed in 71 *Hcp100* sequences, which supports the fungal findings. Based on the neighbour-joining and maximum parsimony *Hcp100* sequence analyses, a high level of similarity was found in most Mexican and all Argentinean bat lung samples. Despite the fact that 81·6% of the infections were molecularly evidenced, only three *H. capsulatum* isolates were cultured from all samples tested, suggesting a low fungal burden in lung tissues that did not favour fungal isolation. This study also highlighted the importance of using different tools for the understanding of histoplasmosis epidemiology, since it supports the presence of *H. capsulatum* in *T. brasiliensis* migratory bats from Mexico and Argentina, thus contributing new evidence to the knowledge of the environmental distribution of this fungus in the Americas.

Key words: Bats, *Hcp100* gene, *Histoplasma capsulatum*, *Tadarida brasiliensis*.

* Author for correspondence: Dr M. L. Taylor, Fungal Immunology Laboratory, Department of Microbiology-Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Av. Universidad 3000, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, CP 04510, México DF, Mexico.
(Email: emello@servidor.unam.mx)

INTRODUCTION

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* is a mammal fungal pathogen distributed worldwide. The infection associated with this pathogen is relevant in those geographical areas where histoplasmosis is endemic or epidemic, such as the Ohio and Mississippi valleys in the USA [1] and some Latin American regions with a high frequency of outbreaks [2]. In Mexico, histoplasmosis is extensively distributed throughout the country [2].

Infection is caused by the inhalation of aerosolized microconidia and hyphal fragments of the *H. capsulatum* saprobe mycelial phase, which develop in bird and bat droppings accumulated in specific areas, fostered by the biotic and abiotic factors of that particular environment. *H. capsulatum* causes a systemic mycosis with a primary respiratory infection and it is not transmissible from host to host through the air or through the host's faeces. The high risk of natural bat infection with this fungus in Mexican caves has been well documented by Taylor *et al.* [3].

In recent years, *H. capsulatum* bat isolates of different geographical origin have been grouped according to their DNA polymorphism, which has revealed an important genetic diversity [2, 4, 5]. Based on sequence analyses of four protein-coding gene fragments (*Arf*, ADP-ribosylation factor; *Ole1*, delta-9 fatty acid desaturase; *H-anti*, H antigen precursor; *Tub1*, alpha-tubulin) of 137 *H. capsulatum* isolates from 25 countries, Kasuga *et al.* [6] described eight clades, seven of which were considered as phylogenetic species. The Latin American A clade shows the greatest genetic diversity and includes most of the Mexican *H. capsulatum* isolates, either from human clinical cases or naturally infected bats, whereas, the Latin American B clade consists of a clonal Argentinean *H. capsulatum* clinical isolates' population [6].

H. capsulatum infection in humans was successfully diagnosed in tissue samples using a nested-PCR assay for a fungal-specific fragment of the *Hcp100* gene. This gene encodes an *H. capsulatum* 100-kDa protein, which might be essential for fungal survival in host cells [7]. This molecular marker was validated by Maubon *et al.* [8] and by Muñoz *et al.* [9], for the diagnosis of histoplasmosis in clinical human samples. Nested-PCR of the *Hcp100* gene fragment has also been applied to detect *H. capsulatum* infection in tissue samples of captive mammals, which has been well documented in the snow leopard (*Uncia uncia*) [10]. This molecular method was also used to detect

the presence of *H. capsulatum* in contaminated compost, frequently believed to be a source of fungal infection [11], and to corroborate the identification of *H. capsulatum* isolated from captive infected maras (*Dolichotis patagonum*) [12].

In general, all bat species are considered as potential reservoirs and dispersers of this pathogen in nature [4, 5, 13]. Bats can become infected irrespective of their alimentary and migratory behaviours [3, 4, 14]. However, those colonial bat species with extensive migratory routes, such as *Tadarida brasiliensis*, are probably the best candidates to spread *H. capsulatum* in the environment throughout a wide geographical area. *T. brasiliensis* form colonies comprising of thousands to millions of individuals [15], these colonies produce a large amount of droppings, thereby enhancing the fungal infection risk in their different shelters, perhaps related to high exposure to *H. capsulatum* propagules.

In the current study, we used a very sensitive and specific molecular method, nested-PCR of the *Hcp100* gene fragment, to detect the presence of *H. capsulatum* in sampled *T. brasiliensis* lungs, the primary target organ of histoplasmosis. This is the first report using nested-PCR with the *Hcp100* marker to demonstrate the presence of *H. capsulatum* in bats. The study clearly highlights the close association between bats and *H. capsulatum*, contributing to the knowledge of histoplasmosis epidemiology by recording the distribution of *H. capsulatum* infection sources related to habitats of *T. brasiliensis* migratory bats that form high-density colonies.

METHODS

Bat samples

A total of 87 *T. brasiliensis* bats were captured with mist-nets in their roosts during the day. Female and reproductive adult male bats were released, in accordance with the international rules of capture and management of this bat species, as a consequence, only young male bats of non-reproductive stage were selected for this study. Sixty-six bats came from four Mexican states: Chiapas (La Trinitaria cave, samples: M-431P, M-433P–M-437P, M-439P–M-441P), Michoacán (Isla de Janitzio cave, samples: M-444P–M-450P, M-453P), Hidalgo (El Salitre cave, samples: M-454–M-463P, M-498P–M-508P), and Nuevo León (La Boca cave, samples: M-468P–M-471P, M-473P–M-487P, M-489P–M-497P). Twenty-one bats came

from two Argentinean provinces: Tucumán (Dique Escaba grotto, samples: M-510P–M-525P) and Córdoba (Cemetery tunnel, samples: M-AR01–M-AR05). The bats from Mexico were delivered to the laboratory, alive if possible, where they were euthanized by cervical dislocation, according to the recommendations of the Animal Care and Use Committee of the Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), and in accordance with the Mexican Official Guide (NOM 062-ZOO-1999). Each euthanized animal was placed on dry ice until necropsy. Animals captured in Argentina were euthanized in situ by cervical dislocation and their organs were preserved in 70% ethanol and sent to Mexico for DNA extraction. All captured animals were assigned a code number and they were prepared as described previously [3]. Data regarding sex, somatic measures, reproductive condition, weight, and age (determined by the nature of the hair and ossification of their phalanges) for all captured bats, from Mexico or Argentina, were recorded by bat researchers from the Instituto de Ecología, UNAM, Mexico, and from the Instituto Lillo, Tucumán, Argentina. All materials were identified and prepared as described by Anthony [16] and Handley [17]. Taxonomic determination was performed according to Hall [18] and Wilson & Reeder [19].

Bat lung samples were removed aseptically from all animals and frozen at -20°C until DNA extraction. Systematically, each lung was processed for isolation of *H. capsulatum*, as described previously by Taylor *et al.* [3]. Briefly, the lung was homogenized in 0.1 mM phosphate-saline buffer (pH 7.2), supplemented with 50 mg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin, centrifuged at 300 *g* for 10 min, and 0.1 ml supernatant was placed on mycobiotic and brain heart infusion slants (Bioxón, México DF), containing 0.02% Bengal Rose to reduce non-pathogenic fungal contamination. Plates were incubated at 28°C and checked daily during 6 weeks for fungal growth.

DNA samples

Each DNA sample was extracted from bat lungs using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. Negative controls (Milli-Q water) were included in the extraction procedure to detect any contamination. Each extracted DNA sample was frozen at -20°C and screened for *H. capsulatum*, using nested-PCR

targeting a fragment of the *Hcp100* protein coding gene.

Nested-PCR assay of the *Hcp100* gene

This assay was performed as described by Bialek *et al.* [7] with minor modifications implemented by Taylor *et al.* [11], which did not change the specificity and sensitivity of the *Hcp100* marker. Two sets of primers, described by Bialek *et al.* [7], were used: the outer primer sets Hc I (5'-GCGTTCGAGCCTTCCACC-TCAAC-3') and Hc II (5'-ATGTCCCATCGGGC-GCCGTGTAGT-3') delimit a 391-bp fragment of the gene; the inner primer sets Hc III (5'-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3') and Hc IV (5'-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3') delimit a 210-bp fragment unique to *H. capsulatum*. DNA amplification was conducted in a PerkinElmer Cetus DNA thermal cycler (USA) and the first PCR was set up in a 25- μl reaction mixture containing 200 μM of each dATP, dGTP, dCTP, and dTTP (Applied Biosystems Inc., USA), 2 mM MgCl_2 , 100 pmol of each outer primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Applied Biosystems), and 4 μl of bat lung DNA template, which was tested at different concentrations to achieve the fungal DNA concentration required for the amplification. For the second PCR (nested reaction) the mixture consisted of 200 μM of each dNTP, 2 mM MgCl_2 , 100 pmol of each inner primer, 1 U *Taq* DNA polymerase, and 2 μl of the first reaction product which was used as template. Cycling conditions for the first and nested reactions were performed as described previously [7]. Amplification products were electrophoresed. A 100-bp DNA ladder (Gibco Laboratories, USA) was used as molecular size marker. Heterologous DNA (20 ng) from other fungal species such as *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, and *Sporothrix schenckii* (a kind gift from Dr Reyes-Montes, UNAM) together with rat and mouse lung DNA samples at different concentrations were processed as non-related DNA templates and Milli-Q water was used as a negative control. Positive amplification control was performed with DNA (20 ng) of the EH-53 *H. capsulatum* strain from a Mexican clinical case. The presence of PCR inhibitors was ruled out, since a positive control from a tissue sample of a naturally infected bat, confirmed by *H. capsulatum* culture isolation, always amplified the *Hcp100* marker generating the expected sequence.

After ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) staining, the bands were visualized with a UV transilluminator and

images were captured as TIFF files. Nested-PCR products were purified using QIAquick[®] PCR purification kit (Qiagen) and sent to the Molecular Biology Laboratory, Institute of Cellular Physiology (UNAM, Mexico) for sequencing in an ABI-automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequencing of each amplified product was the main criterion to confirm fungal presence in bat lungs.

Sequences

Sequencing reactions were performed for forward and reverse DNA strands and a consensus sequence for each amplified bat lung sample product was generated. Sequences were trimmed to ensure that all sequences had the same start and end-point. Next, they were aligned and compared using MEGA software, version 4.0 [20]. Alignment consisted of the generated sequences from bat samples together with the *Hcp100* sequence of the G-217B strain from Louisiana, USA (GenBank accession no. AJ005963) being used as reference for base positions. Pairwise and multiple parameters were established for a gap opening penalty of 15 and a gap extension penalty of 6.66; transition weight was 0.5; the use of negative matrix was off, and the delay divergent cut-off was 30%.

Neighbour-joining (NJ) [21] and maximum parsimony (MP) [22] analyses for *Hcp100* gene fragments were performed, using MEGA-4 [20] and the G-217B sequence (GenBank) as reference. The NJ tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the genetic distances used to infer the tree. Genetic distances were computed using the Kimura [23] two-parameter model. The MP method [22] was performed, using the close-neighbour-interchange algorithm [24]. NJ or MP bootstrap values [25] for internal branches were generated by 1000 replicates.

BLASTn and BLASTx algorithms were used to search the GenBank database for homologous nucleotide sequences and putative proteins, respectively, corresponding to the nested-PCR product of the *Hcp100* gene fragment from the sequences of bat lung samples analysed.

Statistical approach

The total infection rate was estimated taking into account all studied bats from those bats that had the fungus identified by sequencing of the *Hcp100* marker. A similar estimation was conducted for bat samples from either Mexico or Argentina. The corresponding

Table 1. Number and percentage of *H. capsulatum*-infected bats from different regions of Mexico and Argentina

Mexico				Argentina	
CS	MN	HG	NL	Tucumán	Córdoba
Infected (captured) bats, <i>n</i>					
6 (9)	6 (8)	13 (21)	27 (28)	16 (16)	3 (5)
Infected bats (%)					
66.6	75	61.9	96.4	100	60

CS, Chiapas; MN, Michoacán; HG, Hidalgo; NL, Nuevo León.

95% confidence interval (CI) was calculated by normal distribution.

RESULTS

Based on the molecular detection of a 210-bp fragment from the *H. capsulatum Hcp100* gene of 87 *T. brasiliensis* individuals studied, 71 bats were considered as probably infected; of these, 52 bats came from four different states of Mexico (six from Chiapas, six from Michoacán, 13 from Hidalgo, 27 from Nuevo León) and 19 bats came from Argentina (16 from Tucumán, three from Córdoba) (see Table 1). Sixteen samples did not amplify the *Hcp100* marker. Three *H. capsulatum* isolates were cultured from *T. brasiliensis* lung samples (M-431P, M-436P, M-485P) of bats captured in Mexico.

A total frequency of 81.6% (95% CI 73.4–89.7) of infection was registered taking into account all studied bats; discriminating for Mexico gave a 78.8% (95% CI 68.9–88.7) infection rate from 66 bats analysed, and for Argentina a 90.4% (95% CI 75.2–100) infection rate from 21 bats studied. The numbers of infected bats according to their capture region in relation to the total number of captured bats studied, as well as the percentages of infection in each bat capture region, are presented in Table 1.

Figure 1 illustrates amplified and non-amplified lung DNA samples for the 210-bp *Hcp100* nested reaction products. In all PCR assays, non-specific bands were never observed. The DNA from EH-53 strain (positive control) amplified the expected 210-bp product in all assays. The same was observed with the non-inhibition control (data not shown), whereas Milli-Q water and/or non-related DNA templates from heterologous fungi, as well as from rat and mouse lungs, did not amplify the *Hcp100* marker.

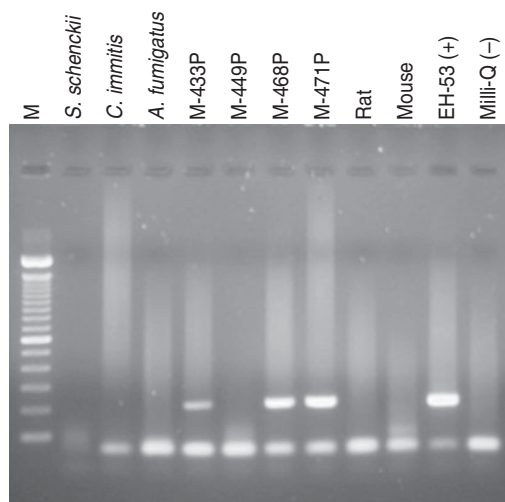


Fig. 1. Representative amplification of the *Hcp100* fragment by nested-PCR. A 100-bp DNA ladder was used as a molecular size marker (M). Heterologous DNA from other fungi and rat and mouse lung DNA samples were used as non-related DNA template. EH-53, Positive control; Milli-Q water, negative control.

Hcp100 specific DNA sequences were detected in the lungs of 71 bats sampled. These sequences were deposited in the GenBank database and bat samples with their respective accession numbers are given in Supplementary Table S1 (available online). Sequences were aligned from 2345 to 2500 (156 nt), using the *Hcp100* sequence of the G-217B strain as reference (Fig. 2), and they revealed four point mutations: thymine substituted by cytosine at position 2436 in all studied sequences; adenine substituted by guanine at position 2353 in sample M-445P (from the state of Michoacán, Mexico); cytosine substituted by thymine at position 2427 (sample M-AR03P from Argentina); and adenine substituted by guanine at position 2466 in samples from two Mexican states (M-490P–M-495P, and M-497P from Nuevo León, as well as M-503P from Hidalgo).

Based on NJ and MP analyses of 71 *Hcp100* sequences of *H. capsulatum* from bat lung samples, two clades are depicted in Figure 3. The optimal NJ tree was generated with the sum of branch length = 0.07. The MP data were: most parsimonious tree (MPT) = 170; tree length (L) = 4.0; consistency index (CI) = 1.0; retention index (RI) = 1.0, and rescaled consistency index (RC) = 1.0.

Clade I, in NJ or MP, was formed by 63 sequences of captured bats from Mexico and Argentina, which included 61 sequences with a common point mutation and two sequences, M-445P from Mexico and M-AR03P from Argentina, with one additional

mutation site for each (Figs 2 and 3), achieving a 99% similarity in these sequences. Moreover, the sequence of G-217B strain, used as reference, was also included in this clade (Fig. 3). Clade II, supported by bootstraps of 64% and 99% for NJ and MP, respectively, was formed with eight sequences of captured bats from Mexico with a particular mutation (adenine substituted by guanine) (Figs 2 and 3). Seven of these sequences (M-490P–M-495P, M-497P) corresponded to La Boca cave in the state of Nuevo León and one (M-503P) from El Salitre cave in the state of Hidalgo (Fig. 3).

According to a search of the nucleotide database, using the BLASTn algorithm, all 71 sequences (156 nt each) of bat lung samples had 99% similarity with the corresponding sequence fragment of the *H. capsulatum* G-217B reference strain (GenBank), 83% similarity for the sequence of a transcription factor of *Ajellomyces dermatitidis* SLH14081 strain (GenBank accession no. XM_002628281), and 75% similarity for the fragment sequence of a hypothetical protein of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 strain (GenBank accession no. XM_002793843).

A search of the protein database using the BLASTx algorithm identified a putative protein fragment of 51 amino acids (aa), corresponding to an open reading frame of 153 nt (2347–2499 nt), which is contained in the 156-nt *Hcp100* amplification product of the 71 *H. capsulatum* sequences tested. Most putative proteins resulting from the lungs of bats showed 100% identity with a fragment of 51 amino acids (731–781 aa) from a total 890 amino-acid sequence of the 100-kDa protein of the *H. capsulatum* G-217B strain (GenBank accession no. CAA06786), with only one exception (asparagine substituted by aspartic acid at position 733) for the putative protein of the M-445P sample (Michoacán, Mexico), which reached 99% identity (data not shown). The 51 amino-acid fragment had 91% identity with a transcription factor protein sequence of *A. dermatitidis* (GenBank accession no. XP_002628327) and 87% identity with a hypothetical protein of *P. brasiliensis* (GenBank accession no. EEH42596).

DISCUSSION

Molecular methods constitute a new tool to detect diverse microorganisms that infect bats and other mammals. The presence of *H. capsulatum* in bats could provide new epidemiological data concerning fungal genetic diversity in bat species and information

	2345	2353	
G-217B	TACGGAGAAACGACCGTGAAGCGAAAAAGCCGACGTCGTTTACATCGACTACGGCAACTCCGAAACCGTTC	CGTGGACC	
M-445PG.....		
61-seq		
M-490PC.....		
M-491P		
M-492P		
M-493P		
M-494P		
M-495P		
M-497P		
M-503P		
M-AR03P		
	2427	2436	2466
G-217B	CGCCTCCGGCCTCTCACGCAGCCGAGTTTTCCGTCGAGAAAATTCGACCCCAAGCCACCGATA	CGTTCTCTCTCT	2500
M-445PC.....		
61-seqC.....		
M-490PC.....		G.....
M-491PC.....		G.....
M-492PC.....		G.....
M-493PC.....		G.....
M-494PC.....		G.....
M-495PC.....		G.....
M-497PC.....		G.....
M-503PC.....		G.....
M-AR03P	..T.....C.....		

Fig. 2. Sequence alignment of 156-nt *Hcp100* fragments amplified from *T. brasiliensis* lung samples. The *Hcp100* sequence from the G-217B strain (GenBank) was used as reference. Point mutations are indicated by nucleotide abbreviations. Sixty-one identical sequences are represented by one aligned sequence, whereas sequences with different mutations are shown.

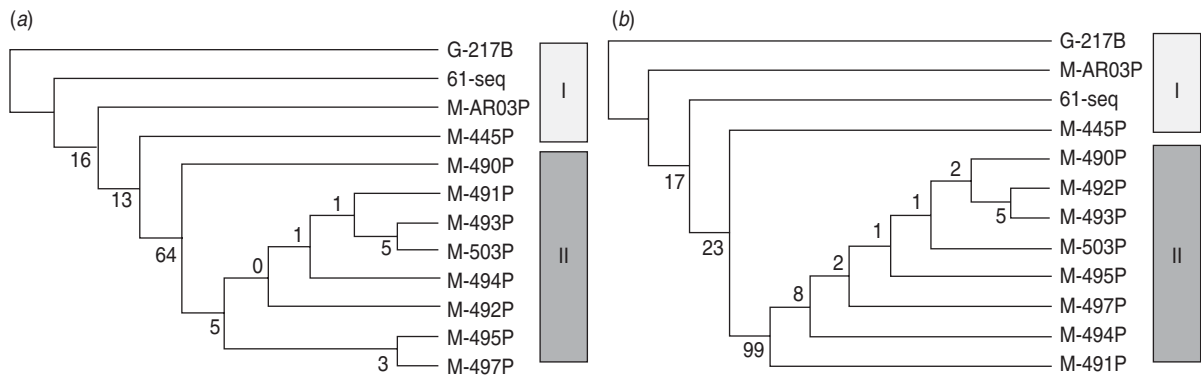


Fig. 3. Unrooted neighbour-joining and maximum parsimony trees of *Hcp100* sequences amplified from *T. brasiliensis* lung samples. (a) Neighbour joining; (b) maximum parsimony. The *Hcp100* sequence from the G-217B strain (GenBank) was used as reference. The bootstrap support values are represented below tree nodes.

regarding their behaviour related to their shelters and lifestyle, as has been suggested by Taylor *et al.* [3]. It is essential to recognize the importance of wild bats in spreading this fungus in nature and the respective repercussions for human disease. The association between bats and *H. capsulatum* had even been observed before the 1960s [26–28], and throughout the 1980s, other studies have also been published on this subject [14, 29–33]. However, this paper is the first to report on the use of molecular screening to detect the presence of *H. capsulatum* in a large sample (87 individuals) of the insectivorous migratory bat *T. brasiliensis*

(Chiroptera: Molossidae), which is one of the most abundant bat species in the Western Hemisphere [15, 34–36], and therefore of importance for the study of bats from different geographical origins from Latin America. The findings described indicate the utility of the molecular marker studied, a unique *Hcp100* gene fragment that successfully identifies the presence of *H. capsulatum* in tissues of captured wild animals, supporting the role of this marker as an available epidemiological tool, as has been demonstrated in histoplasmosis diagnosis in human tissues [7–9].

The present results emphasize an important percentage of *T. brasiliensis* infection with *H. capsulatum*, in either Mexican or Argentinean bats, representing a substantial rate of $\geq 60\%$ infection (Table 1). Establishing the presence of *H. capsulatum* in a wide number of lung samples of *T. brasiliensis* was our main aim. Young male bats in non-reproductive stage were selected for this purpose, according to the criterion mentioned in the Materials and Methods section. Further, based on our experience with other animal models, young male mice are one of the most susceptible hosts for experimental histoplasmosis [37, 38], which allow us to infer that young male bats may also be susceptible hosts for *H. capsulatum* infection compared to adults. Although the young male bat cohort is not representative of bat populations, our findings highlight the high risk of infection of *T. brasiliensis* bats and emphasize the role of bats as reservoirs and dispersers of this fungus. In addition, the high percentages of infected bats could be associated with the high density of *T. brasiliensis* colonies [15], enhancing their infection risk. Moreover, physical conditions of bat shelters could influence the infection risk factor for humans and bats, as has been documented by Taylor *et al.* [3].

Despite the fact that fungal isolation is the gold standard for demonstrating a state of fungal infection, this method has a major limitation in its low sensitivity (a high fungal burden is needed in tissue samples to obtain a successful fungal isolation). Moreover, in environmental samples, contamination with other fast-growing microorganisms interferes with a favourable *H. capsulatum* isolation process. *H. capsulatum* isolation in nature is an unusual finding and, in general, the rate of fungal isolation from bat droppings and/or other contaminated soil, as well as from infected bats, is low [14, 30–33, 39, 40]. However, a high infection rate of 66% in bats captured in Mexico was reported by Taylor *et al.* [3], through *H. capsulatum* cultures from different bat organs.

Although fungal isolation in organs of captured bats is a fortuitous event, three *H. capsulatum* isolates were recovered from cultured bat lungs. Assays were also performed to isolate *H. capsulatum* from other bat organs such as spleen, liver, and intestine, of which we also obtained three isolates (two from spleen and one from liver) of all *T. brasiliensis* bats captured in Mexico (data not shown), confirming the low fungal burden in the tissue of the bats studied. Correlation between mycological and molecular

findings was very low, since only a small number of positive fungal cultures were attained. Molecular methods have been implemented in recent years to detect the presence of fungal pathogens in tissue samples of infected hosts, especially for the molecular diagnosis of histoplasmosis. For this reason, for the detection of *H. capsulatum* in bat tissues we selected a unique molecular marker (*Hcp100* gene fragment) which has been shown to be an excellent tool for revealing the presence of *H. capsulatum* in infected clinical samples [8, 9]. The *Hcp100* marker has a higher sensitivity than fungal isolation in culture media, irrespective of fungal burden in the host, supporting the use of this molecular marker for detection of the pathogen's presence in bat tissues. The high specificity of the *Hcp100* marker was corroborated by absence of non-specific bands, as well as by non-amplification of heterologous DNA from either other fungi or mammalian hosts and negative controls, as can be seen in Figure 1.

A 156-nt sequence included in the 210-bp fragment of the *Hcp100* marker was sufficient to reveal similarity in the sequences obtained from the lungs of bats. Hence, 61 bat lung samples presented identical sequences, supporting a high similarity in these samples. Moreover, 10 sequences, mostly from bats captured on the same date in the La Boca cave, and having an additional mutation site, also remained closely related to all sequences studied. Detected mutations are not due to sequencing errors, since they appeared in several *Hcp100* fragments and were confirmed in both DNA strands. The sequencing of 71 products of the 156 nt sequence revealed high similarity with the corresponding fragment of the *H. capsulatum Hcp100* gene from the G-217B strain (GenBank), confirming that all *Hcp100* sequences from the bat samples belong to *H. capsulatum*.

Despite the *Hcp100* marker showing low polymorphism, two clades associated with infected bats were identified based on the topologies of the NJ and MP trees. Analyses of NJ and MP topologies revealed differences in the studied sequences, irrespective of the geographical origin of *T. brasiliensis* bats sampled in Mexico. It is important to emphasize that some bat lung samples from Nuevo León (M-490P–M-495P, M-497P) and Hidalgo (M-503P), Mexico, diverge from other studied lung samples (clade II). These findings suggest that the clade II *Hcp100* genotype, from the Nuevo León and Hidalgo samples, is associated with distinct shelters for bat infection from these regions, and it may be related to *T. brasiliensis*

migration routes, which are shared throughout the Mexican territory [35, 36].

BLASTn analysis of the 156-nt sequences from 71 bat lung samples revealed the highest similarity for the *H. capsulatum* G-217B strain, followed by the *A. dermatitidis* SLH14081 strain and *P. brasiliensis* Pb01 strain (now classified as *P. lutzii* according to Teixeira *et al.* [41]), which supports the specificity of the 156-nt fragment to detect *H. capsulatum*.

Similarly, a BLASTx analysis also revealed identity in most protein fragments resulting from the sequences of the *Hcp100* marker amplified from the lungs of infected bats and the 100-kDa protein of the *H. capsulatum* G-217B strain, despite three silent mutations being found in most of the sequences analysed. A non-silent mutation (asparagine substituted by acid aspartic at position 2353) of sample M-445P (Michoacán, Mexico) has no known biological implication. BLASTx analysis also supports the specificity of the 156-nt fragment to detect *H. capsulatum*.

Wild bats have a high risk of infection with airborne propagules from this pathogenic fungus that are found in their shelters. Although bats are easily infected, they do not normally develop a severe course of the disease [3]. This study has a critical relevance that should be noted by specialized researchers who work with *H. capsulatum* and bats, which are considered potential reservoirs of this fungus and play an important role in the spread of *H. capsulatum* in the environment [3–5, 13].

NOTE

Supplementary material accompanies this paper on the Journal's website (<http://journals.cambridge.org/hyg>).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants: SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS-M05-A03 (Mexico, France) and DGAPA-PAPIIT-IN203407-3, UNAM. Dr M. L. Taylor thanks L. J. López and A. Gómez Nísino from the Instituto de Ecología, UNAM, for their help in accessing several Mexican caves, with bat captures, and with taxonomic determination, and acknowledges the exceptional help of Dr R. Bárquez from the Instituto Lillo in accessing the Dique Escaba, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. The authors thank I. Mascher for editorial assistance. A. E. González-González

thanks the Biological Science Graduate Program of UNAM and the scholarship of the National Council of Science and Technology, Mexico (CONACyT, ref. no. 23492).

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Tewari R, Wheat LJ, Ajello L.** Agents of histoplasmosis. In: Ajello L, Hay RJ, eds. *Medical Mycology. Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections*. New York: Arnold and Oxford University Press Inc., 1998, pp. 373–407.
2. **Taylor ML, et al.** Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. In: Benedik M, ed. *Research Advances in Microbiology*. Kerala: Global Research Network, 2000, pp. 29–35.
3. **Taylor ML, et al.** Environmental conditions favoring bat infections with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; **61**: 914–919.
4. **Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR.** Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genetics and Biology* 2000; **30**: 207–212.
5. **Taylor ML, et al.** Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005; **45**: 451–458.
6. **Kasuga T, et al.** Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Ecology* 2003; **12**: 3383–3401.
7. **Bialek R, et al.** Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**: 1644–1647.
8. **Maubon D, et al.** Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; **58**: 441–444.
9. **Muñoz C, et al.** Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clinical Vaccine Immunology* 2010; **17**: 62–67.
10. **Espinosa-Avilés D, et al.** Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 2008; **39**: 450–454.
11. **Taylor ML, et al.** Identification of the infection source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005; **45**: 435–441.

12. **Reyes-Montes MR, et al.** Identification of histoplasmosis infection source from two captive maras (*Dolichotis patagonum*) of the same colony by using molecular and immunologic assays. *Revista Argentina de Microbiología* 2009; **41**: 102–104.
13. **Hoff GL, Bigler WJ.** The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *Journal of Wildlife Disease* 1981; **17**: 191–196.
14. **Constantine DG.** Health precautions for bat researches. In: Kunz TH, ed. *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1988, pp. 491–528.
15. **McCracken GF, McCracken MK, Vawter AT.** Genetic structure in migratory populations of the bat *Tadarida brasiliensis mexicana*. *Journal of Mammalogy* 1994; **75**: 500–514.
16. **Anthony ELP.** Age determination in bats. In: Kunz TH, ed. *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1988, pp. 47–58.
17. **Handley CO.** Specimen preparation. In: Kunz TH, ed. *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1988, pp. 437–457.
18. **Hall ER.** *The Mammals of North America*, 2nd edn. New York: John Wiley & Sons, 1981.
19. **Wilson DE, Reeder DAM.** *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, 2nd edn. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1993.
20. **Tamura K, et al.** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; **24**: 1596–1599.
21. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; **4**: 406–425.
22. **Eck RV, Dayhoff MO.** *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Silver Spring: National Biomedical Research Foundation, 1996.
23. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980; **16**: 111–120.
24. **Nei M, Kumar S.** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press, 2000.
25. **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; **39**: 783–791.
26. **Emmons CW.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Reports* 1949; **64**: 892–896.
27. **Emmons CW.** Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Reports* 1958; **73**: 590–595.
28. **Aguirre-Pequeño E.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bat guano in caves of the northeast of Mexico. *Gaceta Médica de México* 1959; **89**: 243–257.
29. **González-Ochoa A.** Relationships among bat habitat and *Histoplasma capsulatum*. *Revista Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mexico)* 1963; **23**: 81–86.
30. **Emmons CW, et al.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the United States. *American Journal of Epidemiology* 1966; **84**: 103–109.
31. **Tesh RB, Schneidau Jr. JD.** Naturally occurring histoplasmosis among bat colonies in the Southeastern United States. *American Journal of Epidemiology* 1967; **86**: 541–551.
32. **DiSalvo AF, et al.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *American Journal of Epidemiology* 1969; **89**: 606–614.
33. **Bryles MC, Cozad GC, Robinson A.** Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in Oklahoma. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1969; **18**: 399–400.
34. **Russel AL, Medellin RA, McCracken GF.** Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat *Tadarida brasiliensis mexicana*. *Molecular Ecology* 2005; **14**: 2207–2222.
35. **López-Vidal JC, et al.** Observations about movements and behaviours of *Tadarida brasiliensis mexicana* in El Salitre cave, Meztlán, Hidalgo, Mexico. In: Lorenzo C, Espinoza E, Ortega J, eds. *Advances in the Study of Mammals from Mexico*, Vol. II. México DF: Publicaciones Especiales Asociación Mexicana de Mastozoología AC, 2008, pp. 615–634.
36. **López-González C, Rascon J, Hernandez-Velazquez FD.** Population structure of migratory Mexican free-tailed bats *Tadarida brasiliensis mexicana* (Chiroptera) in a Chihuahuan Desert roost. *Chiroptera Neotropical* 2010; **16**: 557–566.
37. **Reyes-Montes MR, et al.** Relationship between age and cellular suppressive activity in resistance to *Histoplasma capsulatum* infection. *Sabouraudia* 1985; **23**: 351–360.
38. **Taylor ML, et al.** Immune response changes with age and sex as factors of variation in resistance to *Histoplasma* infection. In: Baxter M, ed. *Proceedings VIII Congress of International Society for Human and Animal Mycology*. Palmerston North: Massey University Press, 1982, pp. 260–264.
39. **Menges RW, et al.** Ecologic studies of histoplasmosis. *American Journal of Epidemiology* 1967; **85**: 108–118.
40. **McMurray DN, Russell LH.** Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; **31**: 527–531.
41. **Teixeira MM, et al.** Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2009; **52**: 273–283.

Manuscript Number: RIAM-D-11-00035R1

Title: Aspectos relevantes del marcador molecular Hcp100 de *Histoplasma capsulatum* y su potencial uso terapéutico en la histoplasmosis

Article Type: Artículo especial

Keywords: Palabras clave: Hcp100 gen; blanco terapéutico; proteína coactivadora.

Key words: Hcp100 gene; therapeutic target; coactivator protein.

Corresponding Author: MsC Antonio E. Gonzalez-Gonzalez, MsC

Corresponding Author's Institution: Universidad Nacional Autonoma de Mexico

First Author: Antonio E. Gonzalez-Gonzalez, MsC

Order of Authors: Antonio E. Gonzalez-Gonzalez, MsC; Maria Lucia Taylor, PhD; Everardo Curiel-Quesada, PhD

Abstract: RESUMEN

Antecedentes: Los hongos patógenos han desarrollado estrategias que involucran la expresión de genes que les ayudan a permanecer y multiplicarse en el huésped. La ausencia de las moléculas codificadas por estos genes podría interferir en el crecimiento y muerte de estos hongos. En el pasado, se reportó un gen (Hcp100) que codifica para una proteína coactivadora del hongo *Histoplasma capsulatum*, el cual se sobreexpresa después de 1 h de contacto entre las levaduras del hongo y los macrófagos murinos. El producto de este gen, una proteína de 100 kDa (Hcp100) de *H. capsulatum*, es probablemente una proteína regulatoria involucrada en los procesos necesarios de adaptación del hongo para la sobrevivencia en las condiciones hostiles intracelulares de los macrófagos. Un fragmento de 210 pb del marcador Hcp100 ha revelado ser una excelente herramienta para la detección molecular de *H. capsulatum* en muestras clínicas. El potencial uso de este gen como blanco terapéutico en *Plasmodium falciparum* ha sido explorado a través de la inhibición del gen y de la proteína p100 del parásito, logrando bloquear su crecimiento.

Métodos: Con base en los antecedentes mencionados, nosotros creemos que la Hcp100 tiene un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de las levaduras de *H. capsulatum* dentro de los macrófagos.

Resultados y conclusiones: Estudiar la probable función de la Hcp100 en la fase de levadura de este patógeno fúngico es relevante para entender su actividad y poder proponerla como un probable blanco terapéutico para el tratamiento de la histoplasmosis.

ABSTRACT

Background: Fungal pathogens have developed strategies, involving genes expression that favors their persistence and multiplication in the host. The absence of molecules encoded by these genes could interfere with the growth and death of these fungi. In the past, a coactivator protein coding gene (Hcp100) of the fungus *Histoplasma capsulatum* was reported, which is overexpressed after 1 h of contact between fungal yeast-cells and murine macrophages. The product of this gene, a protein of 100

kDa (Hcp100) of *H. capsulatum*, is probably a regulatory protein involved in the processes required for fungal adaptation and its survival in the intracellular hostile conditions of the macrophages. A 210-bp fragment of the Hcp100 marker has proved to be an excellent tool for *H. capsulatum* molecular detection in clinical samples. The potential use of this gene as a therapeutic target in *Plasmodium falciparum* has been explored through the inhibition of both, the gene and the protein p100 of the parasite, by blocking its growth.

Methods: Based on the above mentioned antecedents, we believe that the Hcp100 has an important role in the development and maintenance of the *H. capsulatum* yeast cells within macrophages.

Results and conclusions: To study the probable function of Hcp100 in the yeast-phase of this fungal pathogen is relevant to understand its activity and to propose it as a therapeutic target for histoplasmosis treatment.

Opposed Reviewers:

Laboratorio de Inmunología de Hongos
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM,
México DF, 04510, México
Tel/Fax: (52) (55) 5623-2462

México DF, septiembre 23, 2011

Dr. Guillermo Quindós
Revista Iberoamericana de Micología
Editor (Director Ejecutivo)

Por la presente envío **la nueva versión corregida del manuscrito** titulado “**Aspectos relevantes del marcador molecular *Hcp100* de *Histoplasma capsulatum* y su potencial uso terapéutico en la histoplasmosis**” (Ref. RIAM-D-11-00035), para ser considerado para publicación en la *Revista Iberoamericana de Micología*.

Los autores han aprobado la versión corregida del manuscrito donde se realizaron todas las correcciones sugeridas por los revisores. Asimismo, los autores esperan haber cumplido con las expectativas de los revisores.

En espera de que usted encuentre esta nueva versión adecuada para la publicación en la revista, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

Atentamente

Antonio González-González
Autor de correspondencia

1
2
3 **Aspectos relevantes del marcador molecular *Hcp100* de *Histoplasma***
4 ***capsulatum* y su potencial uso terapéutico en la histoplasmosis**
5
6
7
8
9

10
11
12 Antonio Ernesto González-González^{a*}, Maria Lucia Taylor^a, Everardo Curiel-Quesada^b
13
14
15

16
17 ^a*Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México*
18
19 *DF, México*
20
21

22 ^b*Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto*
23
24 *Politécnico Nacional, México DF, México*
25
26
27
28
29
30
31

32 *Autor para correspondencia:
33

34 *Correo electrónico:* antonio.gonzalez04460@lycos.com (A. E. González-González).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESUMEN

1
2
3
4
5 *Antecedentes:* Los hongos patógenos han desarrollado estrategias que involucran la
6
7 expresión de genes que les ayudan a permanecer y multiplicarse en el huésped. La
8
9 ausencia de las moléculas codificadas por estos genes podría interferir en el crecimiento
10
11 y muerte de estos hongos. En el pasado, se reportó un gen (*Hcp100*) que codifica para
12
13 una proteína coactivadora del hongo *Histoplasma capsulatum*, el cual se sobreexpresa
14
15 después de 1 h de contacto entre las levaduras del hongo y los macrófagos murinos. El
16
17 producto de este gen, una proteína de 100 kDa (*Hcp100*) de *H. capsulatum*, es
18
19 probablemente una proteína regulatoria involucrada en los procesos necesarios de
20
21 adaptación del hongo para la sobrevivencia en las condiciones hostiles intracelulares de
22
23 los macrófagos. Un fragmento de 210 pb del marcador *Hcp100* ha revelado ser una
24
25 excelente herramienta para la detección molecular de *H. capsulatum* en muestras
26
27 clínicas. El potencial uso de este gen como blanco terapéutico en *Plasmodium*
28
29 *falciparum* ha sido explorado a través de la inhibición del gen y de la proteína p100 del
30
31 parásito, logrando bloquear su crecimiento.

32
33 *Métodos:* Con base en los antecedentes mencionados, nosotros creemos que la *Hcp100*
34
35 tiene un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de las levaduras de *H. capsulatum*
36
37 dentro de los macrófagos.

38
39 *Resultados y conclusiones:* Estudiar la probable función de la *Hcp100* en la fase de
40
41 levadura de este patógeno fúngico es relevante para entender su actividad y poder
42
43 proponerla como un probable blanco terapéutico para el tratamiento de la
44
45 histoplasmosis.

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58 **Palabras clave:** *Hcp100* gen; blanco terapéutico; proteína coactivadora.
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Relevant aspects of the *Hcp100* molecular marker of *Histoplasma capsulatum* and its potential therapeutic use in histoplasmosis

ABSTRACT

Background: Fungal pathogens have developed strategies, involving genes expression that favors their persistence and multiplication in the host. The absence of molecules encoded by these genes could interfere with the growth and death of these fungi. In the past, a coactivator protein coding gene (*Hcp100*) of the fungus *Histoplasma capsulatum* was reported, which is overexpressed after 1 h of contact between fungal yeast-cells and murine macrophages. The product of this gene, a protein of 100 kDa (Hcp100) of *H. capsulatum*, is probably a regulatory protein involved in the processes required for fungal adaptation and its survival in the intracellular hostile conditions of the macrophages. A 210-bp fragment of the *Hcp100* marker has proved to be an excellent tool for *H. capsulatum* molecular detection in clinical samples. The potential use of this gene as a therapeutic target in *Plasmodium falciparum* has been explored through the inhibition of both, the gene and the protein p100 of the parasite, by blocking its growth.

Methods: Based on the above mentioned antecedents, we believe that the Hcp100 has an important role in the development and maintenance of the *H. capsulatum* yeast cells within macrophages.

Results and conclusions: To study the probable function of Hcp100 in the yeast-phase of this fungal pathogen is relevant to understand its activity and to propose it as a therapeutic target for histoplasmosis treatment.

Key words: *Hcp100* gene; therapeutic target; coactivator protein.

Introducción

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico que tiene una fase micelial saprobia geofílica (forma infectiva) que se asocia con guano de murciélagos y aves, mientras que la fase de levadura (forma virulenta-parasitaria) es frecuentemente encontrada dentro de fagocitos de mamíferos. Este hongo es el agente etiológico de la histoplasmosis, micosis sistémica más común del aparato respiratorio que afecta a humanos y otros mamíferos. La enfermedad es endémica en varias regiones de América y es relevante en áreas geográficas como los valles de Mississippi y Ohio en los Estados Unidos. Por otro lado, la forma epidémica de la histoplasmosis tiene gran impacto en regiones del mundo que exponen poblaciones humanas a alto riesgo de infección, tales como la mayoría de los países Latinoamericanos, en particular, en México debido a que muchos trabajadores rurales pueden desarrollar la forma epidémica por su tipo de actividad ocupacional. En la actualidad, la relevancia de la histoplasmosis se destaca por su asociación con individuos inmunocomprometidos.

Interacciones huésped-patógeno

Patógenos fúngicos como *H. capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* o *Blastomyces dermatitidis* que crecen como saprobios en nichos ecológicos definidos, pueden infectar a un huésped susceptible por inhalación de esporas o fragmentos hifales aerosolizados que se convierten en formas parasitarias (fase levaduriforme) preferencialmente dentro del ambiente intracelular del huésped. Las levaduras, potencialmente virulentas, pueden ser destruidas por fagocitos, sin embargo, ciertas

1 especies de patógenos fúngicos han desarrollado estrategias para evitar la muerte por los
2 mecanismos de defensa del huésped²¹.
3

4 Las interacciones que se llevan a cabo entre el huésped y el parásito fúngico
5 conducen al disparo de una serie de eventos tanto en el huésped como en el parásito. En
6 los primeros, con frecuencia, se expresan moléculas de diferentes tipos, algunas de las
7 cuales participan en la activación de mecanismos para combatir y eliminar el agresor.
8 Por su parte, el parásito también expresa moléculas, algunas de las cuales son
9 morfotipo-específicas, que le ayudarán a evadir los mecanismos de defensa del huésped
10 y a sobrevivir dentro de éste. Entre las estrategias que los patógenos fúngicos han
11 desarrollado, destaca la expresión o sobreexpresión de genes cuyos productos actúan en
12 distintos aspectos del binomio huésped-parásito. Entre las moléculas codificadas por
13 estos genes sobresalen los factores de virulencia y moléculas coactivadoras de la
14 transcripción. La ausencia de algunas de estas moléculas puede conllevar a la inhibición
15 del crecimiento y a la muerte del patógeno.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 En *H. capsulatum* se han descrito algunos factores de virulencia que cumplen
34 con los postulados moleculares de Koch y que son característicos de la fase
35 levaduriforme del hongo, a saber: la proteína Yps3 localizada en la pared celular de la
36 levadura, la proteína de unión a calcio CBP que se expresa fundamentalmente a bajas
37 concentraciones de calcio durante la estancia intracelular y el carbohidrato de pared
38 celular α -(1,3)-glucano^{18,30}. Sin embargo, otras moléculas de *H. capsulatum* han sido
39 consideradas como factores asociados a la virulencia, como el producto del gen *URA5*
40 que participa en la vía biosintética de las pirimidinas siendo importante para la
41 sobrevivencia del hongo en el huésped^{19,30} y la proteína de choque térmico Hsp60 que
42 actúa como ligando para el receptor CR3 (CD11b/CD18) de macrófagos, promoviendo
43 el parasitismo intracelular¹⁵. Es importante destacar que en ensayos de inmunización
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 con la proteína recombinante Hsp60 de *H. capsulatum* se generó una respuesta inmune
2 protectora en el modelo murino⁵, lo que la hace candidata para ser utilizada como
3
4 vacuna.
5
6

9 **Sobreexpresión del gen *Hcp100* de *H. capsulatum***

11
12
13
14 La interacción entre los fagocitos del huésped y *H. capsulatum* es un
15 determinante primario en el curso de la infección y define el destino de *H. capsulatum*
16 en el huésped. En estas interacciones se encuentran involucrados factores de virulencia
17 fúngicos así como componentes de la inmunidad innata e inmunidad adaptativa del
18 huésped, particularmente de la inmunidad celular. Los hongos patógenos una vez
19 fagocitados exhiben una importante reprogramación transcripcional y traduccional que
20 se refleja en las estrategias de sobrevivencia y adaptación a las condiciones hostiles del
21 fagocito. Las células fúngicas tienen la capacidad para explorar el ambiente circundante
22 y modificar apropiadamente su perfil transcripcional²¹.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Colonna-Romano et al⁴, realizaron un estudio comparativo, por despliegue
37 diferencial/RT-PCR, del patrón de expresión de genes de *H. capsulatum* antes y después
38 de la exposición de levaduras del hongo a macrófagos murinos y, asimismo, durante su
39 internalización. Los resultados mostraron varias clonas de cDNA a partir de los
40 transcritos obtenidos. Seis de los transcritos fueron expresados diferencialmente, cinco
41 manifestaron sobreexpresión en los momentos iniciales de la interacción macrófago-
42 hongo (15 min) y hasta después de 1 h de internalización. Uno de estos transcritos,
43 presentó los niveles más altos de sobreexpresión después 1 h de infección, cuando el
44 95% de las levaduras se encontraban intracelularmente. Porta et al¹⁷, caracterizaron la
45 proteína codificada por una de las clonas de cDNA (pHc12) obtenida por Colonna-
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Romano et al⁴ y, mediante un ensayo de Northern blot, confirmaron que el transcrito de
2 esta clona se expresaba cinco veces más después de 1 h de contacto entre los
3 macrófagos murinos y las levaduras de *H. capsulatum*, considerando la transcripción
4 basal antes de la infección.
5
6
7
8
9

10 **Estructura de la proteína de 100 kDa de *H. capsulatum* (Hcp100)**

11
12 El análisis de la secuencia del cDNA del transcrito de la clona pHc12 reveló un
13 marco de lectura de 890 residuos de aminoácidos. El análisis por BLAST de la
14 secuencia de aminoácidos presentó una identidad entre el 30-33% con las secuencias de
15 las proteínas coactivadoras de 100 kDa de humano y *Caenorhabditis elegans*, así como
16 con la proteína de 105 kDa de rata. La identidad entre las secuencias de aminoácidos de
17 la Hcp100 de *H. capsulatum* y las proteínas de la familia p100 fue analizada por
18 “Hydrophobic Cluster Analysis” y los valores obtenidos reflejaron una relación putativa
19 entre las proteínas analizadas. Con base en estos análisis, se estableció que la proteína
20 obtenida de la clona pHc12 de *H. capsulatum* es un miembro de la familia de las
21 proteínas de 100 kDa (p100).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 El marco de lectura encontrado por Porta et al¹⁷, en la secuencia de la Hcp100 al
42 igual que las secuencias de las proteínas de 100 kDa de sus homólogos de mamíferos y
43 *C. elegans*, sugiere una estructura que contiene cuatro dominios (I al IV)
44 “staphylococcal nuclease” (SN) de aproximadamente 150 aminoácidos cada uno, los
45 cuales se disponen en “tandem”. Los dominios SN fueron en un inicio reportados para
46 eubacterias y arqueobacterias, siendo posteriormente identificados en eucariotes⁹. En
47 humanos, los dominios SN del I al IV de la proteína p100 interactúan con componentes
48 de la maquinaria basal de la transcripción que incluye la RNA helicasa dependiente de
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ATP (RHA), la subunidad grande de la polimerasa II (PolR2A) y la proteína CREB (CBP/p300)²². Los dominios SN consisten de dos subdominios A y B. El subdominio A está relacionado a una estructura OB-plegada (Oligonucleotide-Oligosaccharide Binding Fold), se presenta en diversas proteínas y tiene la capacidad de unirse a oligonucleótidos y oligosacáridos¹⁴. No es claro si la Hcp100 a través de sus dominios SN se une directamente al DNA o si lo hace a través de interacciones proteína-proteína.

El subdominio B consiste de dos α -hélices plegadas independientemente¹⁷. La repetición de los dominios SN puede ser esencial para alcanzar una completa actividad biológica de la proteína¹⁶. Porta et al¹⁷, reportaron que la Hcp100 contiene un quinto dominio SN modificado, el cual es más largo que los otros cuatro (200 aminoácidos) y posee las dos α -hélices del subdominio B y, adicionalmente, un subdominio A que no corresponde al SN OB-plegada.

Estas observaciones permitieron sugerir que la primera parte del quinto dominio de la Hcp100, designado como subdominio A', es diferente de los subdominios A de los primeros cuatro dominios SN. Este subdominio A' fue asociado al dominio tudor, nombre derivado de la proteína tudor de *Drosophyla melanogaster*, donde fue primeramente reportado¹⁷.

Los dominios tudor se encuentran presentes en proteínas de unión a RNA^{7,24}. Se ha propuesto que los dominios tudor en algunas ocasiones están en contacto directo con los ácidos nucleicos y, en otras ocasiones, este contacto está mediado por interacciones proteína-proteína^{2,29}. Los dominios tudor han sido encontrados en proteínas importantes para el desarrollo de la célula, siendo que muchas de estas proteínas han mostrado estar involucradas en la unión, metabolismo y transporte del RNA^{3,16}. El dominio tudor y el quinto dominio SN interactúan con componentes importantes del RNA "splicing" entre

1
2 los cuales se incluyen componentes proteicos de las ribonucleoproteínas nucleares
3 pequeñas (snRNP) y la proteína nuclear SKIP (SKIIP)²².

4
5 Los dominios tudor muestran un alto grado de divergencia entre organismos de
6 distintas especies (comparten menos del 20% de identidad) y se caracterizan por tener
7 un segmento más conservado de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos y,
8 dentro de este segmento, se encuentran aminoácidos que son invariables. El dominio
9 tudor de la Hcp100 comparte 32.4, 32.4 y 25.1% de identidad con los dominios tudor de
10 humano, rata y *C. elegans*, respectivamente, manteniendo sus características. En este
11 dominio hay tres motivos conservados, designados como x, y, z que incluyen los
12 aminoácidos invariables D⁷²², Y⁷²⁶, R⁷²⁷ (motivo y), D⁷⁴⁶, G⁷⁴⁸ (motivo z), así como el
13 altamente conservado Q⁶⁷⁶ (motivo x) y los aminoácidos aromáticos en la posición 725
14 (motivo x) y el 747 (motivo z)¹⁷. Los aminoácidos conservados en esta familia de
15 dominios tudor tienen un importante papel en la función de las proteínas p100 que Porta
16 et al.¹⁷ designaron como Hcp100 para *H. capsulatum*. Porta et al.¹⁷, en su estudio
17 sugieren que la composición multidominio de esta proteína se asocia a funciones
18 esenciales, entre las que se incluyen la unión a DNA y RNA, debido a la presencia de
19 los dominios SN y tudor. Porta et al.¹⁷, proponen además que la Hcp100 inducida en
20 etapas primarias de la infección puede actuar como una proteína regulatoria involucrada
21 en los procesos de adaptación del hongo dentro de macrófagos murinos, ayudando al
22 patógeno a manifestar su virulencia.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Utilización del marcador *Hcp100* para diagnóstico molecular**

52
53
54
55

56 La infección por *H. capsulatum* ha sido exitosamente monitoreada en tejidos del
57 huésped a través de una PCR-anidada para un fragmento de 210 pb del gen *Hcp100*.
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Este marcador molecular es altamente sensible y considerado único para *H. capsulatum*.

2 En los últimos años, ha sido utilizado para determinar la presencia del hongo en
3 muestras clínicas de humanos como herramienta diagnóstica^{1,12,13,26}.

4
5
6
7 La PCR-anidada realizada con este marcador también ha permitido la detección
8 exitosa de la carga fúngica en tejidos de animales silvestres y cautivos que cursaban
9 histoplasmosis diseminada, aportando datos para la epidemiología molecular de la
10 histoplasmosis^{6,20}. La detección del gen *Hcp100* de *H. capsulatum* en muestras de
11 pulmón de murciélagos infectados amplificó el fragmento esperado de 210 pb de este
12 marcador. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con base en un fragmento de
13 156 nucleótidos (nt) que se encuentra incluido en el fragmento de 210 pb, ya que 54
14 nucleótidos fueron eliminados del análisis por presentar inconsistencias en 71
15 secuencias estudiadas. El alineamiento de este fragmento de 156 nt y subsecuente
16 análisis comparativo por BLASTn con las secuencias de *Ajellomyces dermatitidis* cepa
17 SLH14081 y *Paracoccidioides brasiliensis* cepa Pb01 depositadas en la base de datos
18 del GenBank, reveló un 83 y 75% de similitud con estas respectivas secuencias. Estos
19 porcentajes de similitud pueden ser explicados debido a las cercanas relaciones
20 filogenéticas de *H. capsulatum* con *A. dermatitidis* y *P. brasiliensis* y, asimismo, porque
21 los fragmentos amplificados forman parte de posibles genes ortólogos (datos no
22 publicados).

23
24
25
26 Además, los 156 nt fueron analizados por el algoritmo BLASTx para una
27 búsqueda en el banco de secuencias de proteínas del GenBank, obteniéndose un
28 fragmento de 51 aminoácidos que corresponden a la proteína de 100 kDa de *H.*
29 *capsulatum* (*Hcp100*). Cuando este fragmento de 51 aminoácidos fue comparado con
30 secuencias de proteínas de otros hongos, los valores más altos de identidad se
31 obtuvieron con la secuencia de un factor de transcripción de *A. dermatitidis* (91%) y con
32

1 una proteína hipotética de *P. brasiliensis* (87%). Estos valores tan altos de identidad nos
2 indican que probablemente se trate de la misma proteína en organismos distintos. La
3
4 figura 1 muestra las identidades y diferencias en la estructura de las proteínas de 100
5
6 kDa de *H. capsulatum*, *A. dermatitidis* y *P. brasiliensis*.
7
8
9

10 11 12 **Porque es importante estudiar la proteína Hcp100**

13
14
15

16 Como ha sido señalado, la familia de proteínas de 100 kDa es multifuncional y
17 esto se debe principalmente a su compleja estructura de dominios.
18
19

20 En células de humano, la p100 fue caracterizada como un coactivador de la
21 transcripción, interactuando con varios factores de transcripción para aumentar su
22 actividad, incluyendo el EBNA-2^{8,25}, STAT5, STAT6^{11,27} y el c-Myb¹⁰.
23
24
25
26
27

28 Evidencias recientes sugieren que la p100 de humano actúa como puente para la
29 unión de los factores de transcripción con los componentes de la maquinaria de
30 transcripción, por ejemplo, forma parte de la unión entre c-Myb y Pim-1¹⁰, así como de
31 la unión entre STAT6 y CBP, STAT6 y RNA-helicasa A^{27,28}. Igualmente, se ha
32 demostrado que la p100 de humano interactúa con snRNP facilitando el ensamblaje del
33 “spliceosome”³¹.
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 Las proteínas de la familia p100 realizan múltiples funciones en la célula de
44 diferentes organismos, lo que sugiere su importancia en procesos vitales de la célula y la
45 hacen meritoria de estudios exhaustivos.
46
47
48
49
50

51
52
53 **Propuesta para considerar el gen *Hcp100* y su proteína codificante, como posible**
54
55 **blanco terapéutico para la histoplasmosis**
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
Debido a que las proteína que se unen a RNA tienen un importante papel en la regulación post-transcripcional de la expresión de genes y, por lo tanto, en las funciones de la célula, se estudiaron dos proteínas de *Plasmodium falciparum* (agente etiológico de la malaria) que tienen la capacidad de unirse a RNA, para probarlas como posibles blancos terapéuticos⁹. La búsqueda mediante BLASTn, en la base de datos PlasmoDB, reveló que la proteína p100 de *P. falciparum* posee un dominio tudor que se une a RNA. Mediante el uso del inhibidor de nucleasas 3',5'-desoxitimidina bifosfato se reprimió la función de la proteína, lo que ocasionó la inhibición del crecimiento y desarrollo del parásito, lo que sugiere un papel importante de esta proteína en el ciclo de vida del parásito⁹.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
En un estudio muy interesante, realizado por Sunil et al²³, la actividad del gen de la p100 de *P. falciparum* fue silenciada por RNA de interferencia con el objetivo de detener el crecimiento y desarrollo del parásito *in vitro* y, proponer, este gen y su producto como posibles blancos terapéuticos para el agente etiológico de la malaria. Además, utilizando estadios sanguíneos asexuales del parásito, el silenciamiento del gen provocó el cese tanto del crecimiento del parásito como de su desarrollo en el estado de trofozoito. Estos resultados, junto con los obtenidos por Hossain et al⁹, demostraron que la p100 es esencial para el ciclo de vida del parásito.

43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Con base en los ensayos de Hossain et al⁹ y Sunil et al²³, sobre el gen y la proteína p100 de *P. falciparum* utilizados como posible blanco terapéutico, en nuestro grupo de investigación se considera la posibilidad de aplicar estas estrategias para *H. capsulatum*, ya que ha sido demostrado que el gen y, principalmente la proteína codificada, cumplen con importantes funciones en la célula fúngica. Aunque, el *Hcp100* es un gen que posee ortólogos en diversos organismos, la diversidad tanto del gen como

1 de la proteína los presentan como posibles candidatos para blancos terapéuticos, ya que
2 existen regiones específicas únicas de estos marcadores para *H. capsulatum*.
3
4
5
6

7 **Conflicto de intereses**

8
9

10
11 Los autores declaran que no existe ningún tipo de conflicto de interés.
12
13
14
15

16 **Bibliografía**

17
18
19
20

- 21 1. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al.
22 Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in
23 human tissue. J Clin Microbiol. 2002; 40: 1644-7.
24
25
- 26 2. Buhler D, Raker V, Lahrman R, Fischer U. Essential role for the tudor domain of
27 SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy.
28 Hum Mol Genet. 1999; 8: 2351-7.
29
30
- 31 3. Callebaut I, Mornon JP. The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain
32 organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor
33 protein involved in *Drosophila melanogaster* development. Biochem J. 1997; 321: 125-
34 32.
35
36
- 37 4. Colonna-Romano S, Porta A, Franco A, Kobayashi GS, Maresca B. Identification
38 and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by *Histoplasma*
39 *capsulatum* during macrophages infection. Microb Pathog. 1998; 25: 55-66.
40
41
- 42 5. Deepe GSJr, Gibbons RS. Cellular and molecular regulation of vaccination with heat
43 shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 2002; 70: 3759-67.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
6. Espinosa-Avilés D, Taylor ML, Reyes-Montes MR, Pérez-Torres A. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (*Uncia uncia*). *J Zoo Wildl Med.* 2008; 39: 450-4.
 7. Golumbeski GS, Bardsley A, Tax F, Boswell RE. Tudor, a posterior group gene of *Drosophylla melanogaster*, encodes a novel protein and an mRNA localized during mid-oogenesis. *Genes Dev.* 1991; 5: 2060-70.
 8. Hossain MJ, Korde R, Singh PK, Kanodia S, Ranjan R, Ram G, et al. *Plasmodium falciparum* tudor staphylococcal nuclease interacting proteins suggest its role in nuclear as well as splicing processes. *Gene.* 2010; 468: 48-57.
 9. Hossain MJ, Korde R, Singh S, Mohammed A, Dasaradhi PVN, Chauhan VS, et al. Tudor domain proteins in protozoan parasites and characterization of *Plasmodium falciparum* tudor staphylococcal nuclease. *Int J Parasitol.* 2008; 38: 513-26.
 10. Levenson JD, Koskinen PJ, Orrico FC, Rainio EM, Jalkanen KJ, Dash AB, et al. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol Cell.* 1998; 2: 417-25.
 11. Low SH, Vasant S, Larson CH, Mukherjee S, Sharma N, Kinter MT, et al. Polycystin-1, STAT6, and p100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev Cell.* 2006; 10: 57-69.
 12. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58: 441-4.
 13. Muñoz C, Gómez BL, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 62-7.

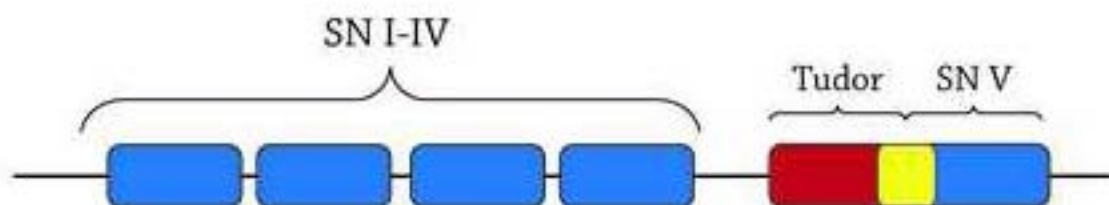
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
14. Murzin AT. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* 1993; 12: 861-7.
 15. Nosanchuk JD, Gacser A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *Microbes Infect.* 2008; 10: 973-7.
 16. Ponting CP. Tudor domains in proteins that interact with RNA. *TIBS.* 1997; 22: 51-2.
 17. Porta A, Colonna-Romano S, Callebaut I, Franco A, Marzullo L, Kobayashi GS, et al. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254: 605-13.
 18. Rappleye CA, Goldman WE. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60: 281–303.
 19. Retallack DM, Heinecke EL, Gibbons R, Deepe GS, Woods JP. The *URA5* gene is necessary for *Histoplasma capsulatum* growth during infection of mouse and human cells. *Infect Immun.* 1999; 67: 624–9.
 20. Reyes-Montes MR, Rodríguez-Arellanes G, Pérez-Torres A, Rosas-Rosas AG, Parás-García A, Juan-Sallés C, et al. Identification of histoplasmosis infection source from two captive maras (*Dolichotis patagonum*) of the same colony by using molecular and immunologic assays. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41: 102-4.
 21. Seider K, Heyken A, Lüttich A, Miramón P, Hube B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13: 392-400.
 22. Sündstrom JF, Vaculova A, Smertenko AP, Savenko EI, Golovko A, Minina E, et al. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionary conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 1347-54.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
23. Sunil S, Hossain MJ, Ramasamy G, Malhotra P. Transient silencing of *Plasmodium falciparum* tudor staphylocccocal nuclease suggests an essential role for the protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 372: 373-8.
 24. Thomson T, Lasko P. Tudor and its domains: germ cell formation from a tudor perspective. *Cell Res.* 2005; 15: 281-91.
 25. Tong X, Drapkin R, Yalamanchili R, Mosialos G, Kieff E. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE, *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 4735-44.
 26. Toranzo AI, Tirabochi IN, Fernández N, Ibarra-Camou B, Rivas MC, Lee W, et al. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Rev Argent Microbiol.* 2009; 41: 20-6.
 27. Valineva T, Yang J, Palovuori R, Silvennoinen O. The transcriptional coactivator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. *J Chem Biol.* 2005; 280: 14989-96.
 28. Valineva T, Yang J, Silvennoinen O. Characterization of RNA helicase A as a component of STAT6 enhancement. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: 3938-46.
 29. Wang J, Dreyfuss G. Characterization of functional domains of the SMN protein *in vivo*. *J Chem Biol.* 2001; 276: 45387-93.
 30. Woods JP. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol.* 2002; 35: 81-97.
 31. Yang J, Välineva T, Hong J, Bu T, Yao Z, Jensen ON, et al. Transcriptional coactivator protein p100 interacts with snRNP proteins and facilitates the assembly of the spliceosome. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 4485-94.

Leyenda de Figura

Figura 1. Estructura de las proteínas de la familia p100 de hongos dimórficos. La figura muestra un esquema de las proteínas de 100 kDa de *H. capsulatum*, *A. dermatitidis* y *P. brasiliensis*. Se destaca la estructura multidominios de las proteínas y la diferencia del dominio tudor y del quinto dominio SN de la Hcp100, considerando que en *H. capsulatum* el extremo terminal del dominio tudor se superpone con el inicio del quinto dominio SN (resaltado en color amarillo).

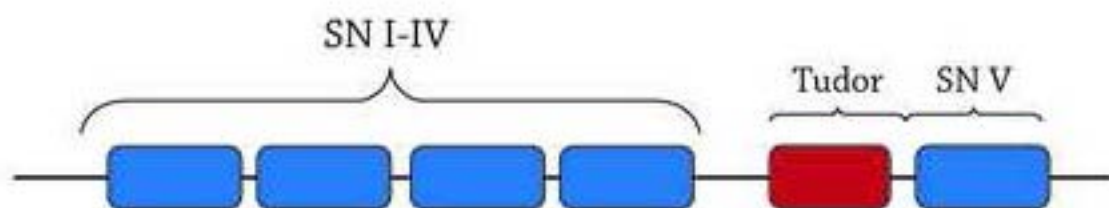
Estructura de la Hcp100 de *Histoplasma capsulatum*



Los dominios SN del I al IV poseen un subdominio de interacción con el DNA y con componentes de la maquinaria basal

Tanto el tudor como el quinto SN son dominios de unión a RNA

Estructura del factor de transcripción de *Ajellomyces dermatitidis* de la cepa SLH14081



Estructura de la proteína hipotética de *Paracoccidioides brasiliensis* de la cepa Pb01



RUNNING HEAD: H. capsulatum PRESENCE IN A BAT FROM FRANCE

**MOLECULAR DETECTION OF Histoplasma capsulatum IN THE LUNG OF A
FREE—RANGING COMMON NOCTULE (Nyctalus noctula) FROM FRANCE,
USING THE Hcp100 GENE**

Antonio Ernesto González-González, M.Sc., José Antonio Ramírez, M.Sc., Cécile Marie Aliouat-Denis, Ph.D., Christine Demanche, Ph.D., El Moukhtar Aliouat, Ph.D., Eduardo Dei-Cas, M.D., Ph.D., Magali Chabé, Ph.D., and Maria Lucia Taylor, Ph.D.

From the Department of Microbiology-Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico DF, 04510, Mexico (González-González, Ramírez, Taylor); Department of Parasitology-Mycolology, Faculty of Biological and Pharmaceutical Sciences, University of Lille-Nord-de France, 3 rue du Pr. Laguesse–BP 87-59 006 Lille cedex, Lille, France (Aliouat-Denis, Demanche, Aliouat, Dei-Cas, Chabé); Biology and Diversity of Emergent Eukaryotic Pathogens (BDEEP)-Centre for Infection and Immunity of Lille, Pasteur Institute of Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, 1 rue du Pr. Calmette F-59019 Lille Cedex, France (Aliouat-Denis, Demanche, Dei-Cas, Chabé); Department of Parasitology-Mycolology, Faculty of Medicine, University of Lille-Nord-de France, Biology–Pathology Centre, University Hospital Centre, Lille, France (Dei-Cas). Correspondence should be directed to Dr. Taylor (emello@servidor.unam.mx; luciataaylor@yahoo.com.mx).

Abstract: Histoplasma capsulatum is a dimorphic fungus that is widely distributed in the tropical or subtropical areas of the world and infects several mammalian hosts, mainly bats. Infective propagules grow in bat and bird droppings. A specific molecular marker, a highly sensitive fragment of a co-activator protein-coding gene (Hcp100), was used to detect H. capsulatum in lung samples of wild and captive bats from France using a nested-PCR. To determine whether bats in France are potential carriers of H. capsulatum, 83 bats were sampled from two regions in France. Sixty-one specimens belonging to the Pteropus rodricensis (45) and Rousettus aegyptiacus (16) species were collected from a zoological park (La Palmyre). Twenty-two specimens were recovered from the Natural History Museum (Bourges), including the Plecotus austriacus (1), Pipistrellus pipistrellus (3), and Nyctalus noctula (18) species. From the lung DNA samples of 83 bats, only one of a N. noctula bat from Bourges amplified the H. capsulatum Hcp100 marker. The amplified product was sequenced and revealed a high similarity to the G217B H. capsulatum reference strain sequence that was deposited in the GenBank database. This finding suggests the presence of H. capsulatum in environmental infection sources for chiropters in France.

Key words: Histoplasma capsulatum, bats, France, Hcp100 marker, molecular detection.

INTRODUCTION

Histoplasma capsulatum var. capsulatum is a dimorphic fungal pathogen of mammals that is preferentially distributed in the tropical and subtropical geographic areas of the world. It is the causative agent of histoplasmosis, which is the most important systemic mycosis in the Americas.^{8,22,24} This fungus has been identified by histological and immunological

methods in the skin, lymph nodes, and several internal organs of badgers (Meles meles) that were randomly captured in some countries of Europe.^{2,7,25} The occurrence of the fungus in the environment of the European continent indicates that the organism is not limited to subtropical and tropical countries. H. capsulatum is found in bird and bat droppings that mainly accumulate within in confined spaces.^{16,18-22} It has been proposed that bats are considered reservoirs and dispersers of H. capsulatum in nature.^{6,16,17} Molecular screening of the presence of H. capsulatum in bat tissues can allow the monitoring of its distribution in a particular region. The presence of the fungus has been revealed in humans and other mammalian tissues using different strategies. H. capsulatum infection has been successfully detected in tissues using a nested-PCR assay for a 100-kDa protein-coding gene (Hcp100), which is a molecular marker that is highly sensitive and specific in detecting the H. capsulatum infection in human clinical samples.^{3,10,11,23} This marker has allowed the successful detection of the fungal infection in the spleen of two captive snow leopards (Uncia uncia) and it has also been used to corroborate the identification of H. capsulatum isolated from the spleen, liver, and adrenal gland of two maras (Dolichotis patagonum) with disseminated histoplasmosis.^{5,14} Based on the usefulness of the Hcp100 molecular marker to demonstrate the presence of H. capsulatum in host tissues, this marker was used in the present study to detect the fungus' presence in the lungs of wild and captive bats from two regions in France.

MATERIALS AND METHODS

Bat samples

Eighty-three bats were studied. Sixty-one bats from the La Palmyre zoological park (in La Palmyre, western France) were born and died in captivity. They belonged to the following non-migratory and frugivorous species: Pteropus rodricensis (n=45) and Rousettus aegyptiacus (n=16). Twenty-two bats from the Natural History Museum of Bourges (in Bourges, central France) were found dead in their wild habitat; these bats belonged to the following insectivorous species: the non-migratory Plecotus austriacus (n=1) and Pipistrellus pipistrellus (n=3), and the migratory Nyctalus noctula (n=18). All of the dead bats were recovered from their environments in an excellent undecayed state by the specialists from the zoological park and from the Natural History Museum. A code number was assigned to each bat and each specimen was individually stored and frozen in a plastic bag at -20°C at their respective sites of origin until being processed. The lung samples of all the specimens were removed aseptically, preserved in 70% ethanol and transported to the University of Lille-Nord, France, where the samples were maintained at -20°C until required for DNA extraction.

DNA lung samples

DNA was extracted from each bat lung using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, California 91355, USA) according to the manufacturer's instructions. Negative controls were included in the extraction procedure to monitor for contamination. All extracted DNAs were frozen at -20°C and screened for H. capsulatum, using nested-PCR that targeted a fragment of the Hcp100 protein-coding gene.

Nested-PCR assay of the Hcp100 gene fragment

This assay was performed as described by Bialek et al.³ with minor modifications by Taylor et al.,²¹ which did not change the specificity and sensitivity of the Hcp100 marker. Two sets of primers were used: the outer primer set HcI (5'-GCGTTCCGAGCCTTCCACCTCAAC-3') and HcII (5'-ATGTCCCATCGGGCGCCGTGTAGT-3') delimits a 391-bp fragment of the gene; the inner primer set HcIII (5'-GAGATCTAGTCGCGGCCAGGTTCA-3') and HcIV (5'-AGGAGAGAACTGTATCGGTGGCTTG-3') delimits a 210-bp fragment unique to H. capsulatum. The primers were supplied by Operon Technologies, Inc. (Alameda, California 94501, USA). DNA amplification was conducted in a Perkin-Elmer Cetus DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Emeryville, California 94608, USA). The first PCR was set up in a 25- μ l reaction mixture containing 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) (Applied Biosystems Inc., Foster City, California 94404, USA), 2 mM MgCl₂, 100 pM of each outer primer, 1 U Taq-DNA polymerase (Applied Biosystems), 1X PCR buffer (Applied Biosystems), and 4 μ l of each bat-lung DNA template, which was tested at various concentrations to achieve the fungal DNA concentration required for the amplification. The thermocycling conditions were as follows: one cycle at 94°C for 5 min; 35 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min; and a final cycle at 72°C for 5 min. For the second PCR (nested reaction), the mixture included 200 μ M of each dNTP, 2 mM MgCl₂, 100 pM of each inner primer, 1 U Taq-DNA polymerase, 1X PCR buffer (Applied Biosystems), and 2 μ l of the first reaction product that was used as template. The thermocycling conditions were as follows: one cycle at 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 1 min; and a final extension cycle at 72°C for 5 min. The positive amplification control was performed using DNA (20 ng) of the EH-53 H. capsulatum strain from a Mexican clinical case. A rat-lung DNA sample (at various concentrations) and Milli-Q water were used as the non-related DNA template and the negative control, respectively. Amplification products

were revealed in 1.5% agarose gel electrophoresis with 0.5X Tris-borate-EDTA buffer, pH 8.0. Electrophoresis was conducted at 90 V for 60 min. The 100-bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, California 92008, USA) was used as molecular size marker. The bands were visualized with a UV-transilluminator MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP Inc., Upland, California 91786, USA) after ethidium bromide (0.5 µg/ml) staining. Images were captured and saved as TIFF files using the VisionWorksLS version 6.1.1 documentation system (UVP).

The specific H. capsulatum 210-bp product was purified using the QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) and sent to the Molecular Biology Laboratory, Cellular Physiology Institute, UNAM, for two- strands sequencing in an ABI-automated DNA sequencer (Applied Biosystems). The generated sequence was deposited in the GenBank database. The sequence of the amplified product was the unique criterion used to identify the fungal presence in the bat lungs.

Sequences

Sequence alignment and the neighbor-joining (NJ) tree were constructed using the generated sequence and four reference sequences from the Fungal Immunology Laboratory, Department of Microbiology-Parasitology, Faculty of Medicine, UNAM, which were previously determined from the lungs of naturally infected bats captured in Mexico: M-484P, M-501P, M-527P, and M-506P (GenBank accession numbers: HM921044, HM921045, HM921046, and HM921047, respectively). The sequences were aligned in ClustalW version 2.0 using the MEGA program version 4.¹⁵ The alignment was accomplished using 156 nucleotides (nt), from nt 2345 to nt 2500, that were included in the 210-bp fragment of the Hcp100 marker. Pairwise and multiple parameters were settled for the Gap Opening Penalty

of 15 and Gap Extension Penalty of 6.66, the transition weight was 0.5, the use of negative matrix was off, and the delay divergent cutoff was 30%.

The NJ analysis was performed using MEGA-4.¹⁵ The sequence of the G217B H. capsulatum human strain from the USA (GenBank accession number AJ005963) was used as an outgroup. The NJ tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the genetic distances that were used to infer the tree. Genetic distances were computed using the Kimura two-parameter model.⁹

RESULTS

Molecular detection of the presence of H. capsulatum in bats-lung tissue revealed that one specimen (sample N014) out of the 18 N. noctula sampled from the 22 bats from Bourges displayed amplification of the 210-bp fragment of the Hcp100 gene.

The positive control amplified the 210-bp product in all assays, whereas the negative control with Milli-Q water did not amplify the Hcp100 fragment; furthermore, non-specific bands were not observed in the resolved agarose gel electrophoresis. In additional assays, the non-related DNA template from rat lungs did not amplify the Hcp100 marker (data not shown).

The Hcp100 sequence from the lung of N. noctula, sample N014, was deposited in the GenBank database (accession number HM921048). This sequence was aligned, edited, and compared with sequences generated from the lungs of four sampled bats in Mexico (M-484P, M-501P, M-527P, and M-506P) and with the sequence of the G217B strain from the USA (Fig. 1). Based on the sequence of the G217B strain deposited in the GenBank, only one nucleotide substitution was registered: a thymine by cytosine at position 2466 in the Hcp100

sequence of the N014 sample and in all sequences of the aligned Mexican bat-lung samples (Fig. 1).

The NJ sequences analysis of the N014 sample from Bourges and the samples from Mexico disclosed a 100% similarity of the 100-kDa protein-coding gene (Fig. 2).

DISCUSSION

The present study is the first report demonstrating the presence of H. capsulatum in the pulmonary tissue of a wild-life (N. noctula) bat in France, which used a nested-PCR assay that targeted the specific H. capsulatum Hcp100 marker. This finding was confirmed based on the sequence of this pathogen-specific molecular marker (Figs. 1 and 2).

All of the processed animals had been recovered from their environments in an excellent undecayed state, which suggested that their deaths had been recent. No evidence of tissue decomposition was observed in any animal that was processed.

Bats have a high risk of infection by the airborne H. capsulatum propagules that are found in several environments. Although bats are easily infected, they do not normally develop a severe course of the disease.¹⁸ The primary organ target of this pathogen is the lung, where the fungus arrives via the respiratory tract. Consequently, in a dead animal, this route of infection is blocked and, we can thus assume that the bat was infected while alive. Furthermore, our molecular results did not correspond to a postmortem contamination.

Although only one out of the 83 studied bats displayed the presence of the fungus, this result is relevant because both the clinical notification of histoplasmosis and the environmental identification of H. capsulatum are considered rare findings in Europe. However, human autochthonous histoplasmosis has been registered in Italy, Germany, and

Turkey,¹ additionally, the presence of the pathogen was demonstrated in a few badgers reported in Denmark, Austria, and Germany.^{2,7,25} Given that H. capsulatum in a N. noctula bat was probably acquired in natural conditions as has been reported for infected badgers,^{2,7,25} an ecological niche for this fungus must be found in Europe.

Different migration routes have been associated with the northern, central, and eastern European N. noctula genetic populations.¹² Therefore, it is probable that N. noctula acquired H. capsulatum in European regions along its migratory routes. It was not possible to infer any relationship between the risk of fungal infection and the bats' behavioral patterns, because only one bat specimen demonstrated the presence of the fungus.

Captive bats, which were born and died in captivity, were used to detect the presence of the fungus in different environments, irrespective of the geographic region in France. The conditions in the captive facilities (including the substrates, temperature, and ventilation) could have been a factor affecting the negative results in detecting the fungus presence in 61 captive bats. These results suggest that the bats that were sampled from the La Palmyre zoological park probably had a low risk of infection. The interest in studying captive bats arose from two previous collaborations with different zoo parks from Mexico, such as the Africam Safari (state of Puebla) and the Queretaro zoo park (state of Queretaro), where the fungal presence in captive maras and snow leopards has been described,^{5,14} despite the fact that the captive conditions of these animals were well controlled.

The alignment and NJ analyses of the Hcp100 sequence of the N014 bat-lung sample from Bourges, France, together with other sequences from Mexico, confirmed the presence of H. capsulatum in N. noctula, based on the high similarity of the fungus sequence of the N014 bat-lung sample with the four sequences from infected bats from Mexico and the sequence of the H. capsulatum G217B strain that was used as a reference and/or outgroup. Despite one

point mutation, close matches were found among most of the analyzed H. capsulatum sequences.

The high specificity of the 210-bp amplification product of Hcp100 was always associated with the absence of non-specific bands, either in the suitable negative control with Milli-Q water or in the non-related DNA template from rat lungs. Although, a 210-bp fragment (from nt 2291 to nt 2500) of this marker has been considered unique for the identification of H. capsulatum, in the present study this fragment was trimmed to ensure that all sequences analyzed had the same start- and end-point. Then, a 156-nt fragment from nt 2345 to nt 2500 was obtained and edited. The 156-nt fragment was sufficient to disclose the similarity of the sequences that were analyzed from the lungs of the bats probably infected by H. capsulatum.

Although homologous protein-coding genes have been referenced in human, rat, and Caenorhabditis elegans, analysis of their amino acid sequences has revealed a very low identity of 30, 33, and 33%, respectively, relative to the p100 kDa co-activator protein of H. capsulatum.^{4,13}

Currently, the Hcp100 marker is a novel and useful tool for the molecular diagnosis of clinical cases of histoplasmosis.^{3,10,11,23} The present study is relevant because it records the presence of H. capsulatum in the pulmonary tissue of a N. noctula bat in France, based on the detection of a fragment of the Hcp100 gene.

CONCLUSION

The present study confirms the presence of H. capsulatum in a species of wild bats in France and thus contributes new evidence for the environmental distribution of this fungus worldwide.

Acknowledgments: This work was supported by the following grants: Secretaria de Educación Pública-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-Mexico/ECOS-NORD-France, ref. M05-A03; French Ministry of Research and Education (EA3609 Lille 2 University Quadrennial Contract, 2006-2009); and Dirección General de Apoyo al Personal Académico-UNAM, ref. PAPIIT/IN-203407-3. The authors thank Doctor L. Arthur and Doctor M. Lemaire (Natural History Museum, Bourges) and Veterinary Doctor Thierry Petit (zoological park of La Palmyre, France), for supplying bat samples. The authors also thank Ingrid Mascher for editorial assistance. A. E. González-González thanks the Biological Science Graduate Program of UNAM and the CONACYT scholarship (Ref. No. 23492).

LITERATURE CITED

1. Ashbee, H. R., E. G. V. Evans, M. A. Viviani, B. Dupont, E. Chryssanthou, I. Surmont, A. Tomsikova, P. Vachkov, B. Enero, J. Zala, and K. Tintelnot. 2008. Histoplasmosis in Europe: Report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med. Mycol.* 46: 57-65.
2. Bauder, B., A. Kubber-Heiss, T. Steineck, E. S. Kuttin, and L. Kaufman. 2000. Granulomatous skin lesions due to histoplasmosis in a badger (Meles meles) in Austria. *Med. Mycol.* 38: 249-253.
3. Bialek, R., A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nübling, V. J. Robertson, J. Knobloch, and R. Hohle. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of Histoplasma capsulatum DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1644-1647.

4. Colonna-Romano, S., A. Porta, A. Franco, G. S. Kobayashi, and B. Maresca. 1998. Identification and isolation by DDRT-PCR of genes differentially expressed by Histoplasma capsulatum during macrophages infection. *Microb. Pathog.* 25: 55-66.
5. Espinosa-Avilés, D., M. L. Taylor, M. R. Reyes-Montes, and A. Pérez-Torres. 2008. Molecular findings of disseminated histoplasmosis in two captive snow leopards (Uncia uncia). *J. Zoo Wildl. Med.* 39: 450-454.
6. Hoff, G. L., and W. J. Bigler. 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. *J. Wildl. Dis.* 17: 191-196.
7. Jensen, H. E., B. Bloch, P. Henriksen, H. H. Dietz, H. Schonheyder, and L. Kaufman. 1992. Disseminated histoplasmosis in a badger (Meles meles) in Denmark. *APMIS* 100: 586-592.
8. Kauffman, C. A. 2009. Histoplasmosis. *Clin. Chest Med.* 30: 217–225.
9. Kimura, M. A. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
10. Maubon, D., S. Simon, and C. Aznar. 2007. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58: 441-444.
11. Muñoz, C., B. L. Gómez, A. Tobón, K. Arango, A. Restrepo, M. M. Correa, C. Muskus, L. E. Cano, and A. González. 2010. Validation and clinical application of a molecular method for identification of Histoplasma capsulatum in human specimens in Colombia, South America. *Clin. Vaccine Immunol.* 17: 62–67.
12. Petit, E., and F. Mayer. 2000. A population genetic analysis of migration: the case of the noctule bat (Nyctalus noctula). *Mol. Ecol.* 9: 683-690.
13. Porta, A., S. Colonna-Romano, I. Callebaut, A. Franco, L. Marzullo, G. S. Kobayashi, and B. Maresca. 1999. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is

differentially expressed by Histoplasma capsulatum during infection of murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254: 605-613.

14. Reyes-Montes, M. R., G. Rodríguez-Arellanes, A. Pérez-Torres, A. G. Rosas-Rosas, A. Parás-García, C. Juan-Sallés, and M. L. Taylor. 2009. Identification of histoplasmosis infection source from two captive maras (Dolichotis patagonum) of the same colony by using molecular and immunologic assays. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 102-104.

15. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

16. Taylor, M. L., C. B. Chávez-Tapia, and M. R. Reyes-Montes. 2000. Molecular typing of Histoplasma capsulatum isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet. Biol.* 30: 207-212.

17. Taylor, M. L., C. B. Chávez-Tapia, A. Rojas-Martínez, M. R. Reyes-Montes, M. Bobadilla Del Valle, and G. Zúñiga. 2005. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen Histoplasma capsulatum isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45: 451-458.

18. Taylor, M. L., C. B. Chávez-Tapia, R. Vargas-Yáñez, G. Rodríguez-Arellanes, G. R. Peña-Sandoval, C. Toriello, A. Pérez, and M. R. Reyes-Montes. 1999. Environmental conditions favoring bat infections with Histoplasma capsulatum in Mexican shelters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 914-919.

19. Taylor, M. L., J. Granados, and C. Toriello. 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the state of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 39: 375-379.

20. Taylor, M. L., M. R. Reyes-Montes, C. B. Chávez-Tapia, E. Curiel-Quesada, E. Duarte-Escalante, G. Rodríguez-Arellanes, G. R. Peña-Sandoval, and F. Valenzuela-Tovar. 2000. Ecology and molecular epidemiology findings of Histoplasma capsulatum, in Mexico.

In: Benedit, M (ed.). Research Advances in Microbiology, Global Research Network, Kerala, Kerala. Pp. 29-35.

21. Taylor, M. L., G. M. Ruíz-Palacios, M. R. Reyes-Montes, G. Rodríguez-Arellanes, L. E. Carreto-Binaghi, E. Duarte-Escalante, A. Hernández-Ramírez, A. Pérez, R. O. Suárez-Alvarez, Y. A. Roldán-Aragón, R. Romero-Martínez, J. H. Sahaza-Cardona, J. Sifuentes-Osornio, L. E. Soto-Ramírez, and G. R. Peña-Sandoval. 2005. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45: 435-441.

22. Tewari, R., L. J. Wheat, and L. Ajello. 1998. Agents of histoplasmosis. In: Ajello, L., and R. J. Hay (eds.). *Microbiology and Microbial Infections, Medical Mycology*, Topley & Wilson's, 9th ed. Arnold and Oxford University Press, New York, New York. Pp. 373-407.

23. Toranzo, A. I., I. N. Tirabochi, N. Fernández, B. Ibarra-Camou, M. C. Rivas, W. Lee, G. Davel, and C. E. Canteros. 2009. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Rev. Argent. Microbiol.* 41: 20-26.

24. Wheat, L. J., and C. A. Kauffman. 2003. Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 17:1-19.

25. Wohlsein, P., B. Bauder., E. S. Kuttin, L. Kaufman, F. Seeliger, and M. von Keyserlingk. 2001. Histoplasmosis in two badgers (*Meles meles*) in northern Germany. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 108: 273-276.

Figure captions

Figure 1. H. capsulatum Hcp100 sequence alignments from the bat-lung samples. ClustalW was used to align the amplified sequences: N014 sample from Bourges, France (GenBank); M-484P, M-501P, M-506P, and M-527P samples from Mexico (GenBank); and the reference sequence of the G217B strain from the USA (GenBank).

Figure 2. The NJ tree generated using H. capsulatum Hcp100 sequences from the bat-lung samples. Sequences were analyzed by MEGA-4, using 156 nt of the Hcp100 marker. The analyzed sequences were as follows: N014 from Bourges, France (GenBank); M-484P, M-501P, M-506P, and M-527P from Mexico (GenBank); and the G217B strain (outgroup) from the USA (GenBank). Details of the NJ method are described in the Materials and Methods.

2345

G217B TACGGAGAAACGACCGTGAAGCGAAAAAAGCCGACGTCGTTTACATCGACTACGGCAACTCCGAAACCGTTCCGTGGACC
N014
M-484P
M-501P
M-506P
M-527P

2500

G217B CGCCTCCGGCCTCTCACGCAGCCGCAGTTTTCCGTGCAGAAAATTCGACCCCAAGCCACCGATAACAGTTCTCTCCT
N014C.....
M-484PC.....
M-501PC.....
M-506PC.....
M-527PC.....

ND14

M-484P

M-501P

M-527P

M-506P

G217B

0.00005

