

Original

Identificación rápida de *Histoplasma capsulatum* en lisados de cultivo

Belén Ibarra-Camou, Adriana Inés Toranzo, William Lee, Graciela Davel y Cristina Elena Canteros*

Departamento de Micología, INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 18 de abril de 2010

Aceptado el 3 de noviembre de 2010

Palabras clave:

Histoplasma capsulatum
Identificación molecular
PCR

R E S U M E N

Antecedentes: *Histoplasma capsulatum* es el agente causal de la histoplasmosis, micosis asociada principalmente a pacientes inmunocomprometidos. La rápida identificación del hongo a partir del cultivo permite el tratamiento temprano.

Objetivo: Evaluar un sistema de PCR para dos dianas específicas de *H. capsulatum* en lisados acuosos de cultivos.

Métodos: Se utilizaron dos técnicas de PCR previamente descritas que, en reacciones independientes, amplifican fragmentos específicos de 111 y 279 pb del gen AgM de *H. capsulatum*. Se analizaron 248 cepas de *H. capsulatum* y 68 de otras especies fúngicas. Para la amplificación se partió de un lisado acuoso (que contenía el ADN), obtenido por tres ciclos de hervido/enfriamiento rápido a 0 °C. En casos particulares se obtuvo ADN purificado y/o se secuenció el producto de la amplificación.

Resultados: Las técnicas de PCR amplificaron las dos bandas a partir del lisado acuoso de 239 cepas de *H. capsulatum*; las 9 restantes sólo mostraron bandas de amplificación a partir de ADN purificado. No se observó amplificación específica a partir de lisado acuoso ni de ADN purificado de 66 cepas de especies distintas de *H. capsulatum*. Dos cepas de *Emmonsia crescens* presentaron ambas bandas de amplificación cuyas secuencias resultaron tener una homología superior al 97% con secuencias de *H. capsulatum*. El tiempo total de la prueba no superó las 7 h con un 96% de sensibilidad, 97% de especificidad y un valor predictivo positivo de 99%.

Conclusiones: El método es rápido, económico y puede ser utilizado como una alternativa para identificar presuntivamente *H. capsulatum* en lisados de cultivo sin purificar.

© 2010 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* in culture lysates

A B S T R A C T

Keywords:

Histoplasma capsulatum
Molecular identification
PCR

Background: *Histoplasma capsulatum* is the agent of histoplasmosis, a deep mycosis mainly afflicting immunocompromised patients. Rapid identification of the fungus isolated from clinical specimens allows timely administration of specific treatment.

Aim: To assess the ability of a dual PCR system targeting specific *H. capsulatum* DNA sites to identify fungal species in simple aqueous lysates from cultured fungi.

Methods: We analysed the performance of two independent PCR reactions designed to amplify fragments of 111 and 279 bp included in *H. capsulatum*-specific gene AgM. We used 248 *H. capsulatum* strains and 68 isolates of other fungal species. Reaction templates consisted of aqueous lysates of cultured fungi (either in mycelial or yeast phase) obtained after three cycles of boiling and immediate cooling at 0 °C. Selected strains were submitted to conventional DNA extraction and/or sequencing.

Results: Both PCR systems performed identically. Amplification from aqueous lysates was achieved from 239 *H. capsulatum* strains; the remaining 9 strains only showed specific bands when purified DNA was used as template. Of all other fungal species tested, only 2 *Emmonsia crescens* strains amplified *H. capsulatum*-specific bands and sequences of their amplified PCR products matched > 97% with *H. capsulatum* sequences. Total test time did not exceed 7 h with 96% sensitivity, 97% specificity and 99% positive predictive value.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ccanteros@anlis.gov.ar (C.E. Canteros).

Conclusions: The assay is fast, accurate and economical, and can be an alternative method for presumptive identification of *H. capsulatum* in simple culture lysates.

© 2010 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* es un hongo termodimorfo, agente etiológico de la histoplasmosis. Las personas adquieren la infección por inhalación de conidios y pequeños fragmentos de hifas que el hongo desarrolla en la naturaleza. En las últimas décadas hubo un incremento de la enfermedad asociada a pacientes inmunocomprometidos¹⁴.

El diagnóstico se realiza a través del examen microscópico de los especímenes clínicos previa coloración de Giemsa, que permite observar las levaduras intracelulares características de *H. capsulatum*. Esto requiere de un observador experimentado, depende de una buena toma de muestra, y no deja de ser un método presuntivo, puesto que otras especies fúngicas como *Candida glabrata*^{9,18} y *Sporothrix schenckii*¹⁹ pueden confundirse con *H. capsulatum* en los materiales clínicos. El diagnóstico definitivo requiere el desarrollo e identificación del agente causal en cultivo. A 25–28 °C se observan conidios característicos de la fase micelial y a 35–37 °C se desarrollan levaduras. Además de la morfología microscópica de los cultivos, la termoconversión de la fase micelial a levaduriforme o viceversa y la detección de exoantígenos H y M específicos, son pruebas que completan la identificación definitiva de la especie. La aparición de conidios en la fase micelial requiere de 2 a 4 semanas de desarrollo (media de 20 días)^{14,19}. La termoconversión es laboriosa y no siempre exitosa, puesto que en algunos casos no es completa. Por su parte, la detección de exoantígenos requiere entre 4 semanas y 3 meses¹⁶. El hallazgo cada vez más frecuente de aislamientos aberrantes, que no presentan macro y/o micromorfología característica^{21,27,29}, la ausencia de la termoconversión^{17,24} y la producción lenta de exoantígenos aumenta la dificultad en el diagnóstico de la histoplasmosis. Además, hongos miceliales de los géneros *Sepedonium*, *Chrysosporium*, *Corynascus* y *Renispora* pueden producir macroconidios tuberculados rememorando la micromorfología de *H. capsulatum* en su fase micelial^{1,7,8,14}. De lo expuesto, se infiere que la identificación microbiológica clásica de *H. capsulatum* puede ser dificultosa y requiere a veces de tiempos prolongados.

Un avance importante en la identificación fue el AccuProbe *Histoplasma* (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA EE.UU.)¹⁰. La dificultad de este método radica en que pueden observarse reacciones falsas positivas con especies de *Chrysosporium*², *Aspergillus*¹⁰ e incluso *Nocardia asteroides*²⁵; además, la sonda quimioluminiscente posee una baja vida media (seis meses), y el instrumental necesario para la lectura de la reacción posee un elevado costo¹¹.

Recientemente, se comenzaron a desarrollar técnicas utilizando diferentes variantes de la técnica de PCR. Existen métodos basados en los perfiles de amplificación de secuencias repetitivas del ADN cromosómico²³, de las secuencias ITS¹⁹, y del antígeno M (proteína con actividad catalasa)⁸.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de un sistema de dos reacciones de PCR descritas por Guedes et al¹³ en lisados acuosos de cultivos para identificar cultivos de *H. capsulatum*.

Materiales y métodos

Cepas

Se estudiaron 245 cepas de *H. capsulatum* incluidas en la colección de cultivos del Departamento de Micología del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Argentina. Los hongos fueron recibidos en el centro para su identificación entre los años 1988 y 2009. Se incluyeron tres cepas de referencia: Downs (ATCC 38904), G186B (ATCC 26030) y G217B (ATCC 26032). Algunos aislamientos poseían

características atípicas desde el primocultivo (falta de conidiación, morfología aberrante o pigmento poco característico).

Además se analizaron 68 cepas de diversas especies comúnmente involucradas en patologías fúngicas y especies saprófitas que por su morfología pueden confundirse con *H. capsulatum* (tabla 1). El ADN purificado de las especies diferentes de *H. capsulatum* fue gentilmente cedido por los laboratorios de Hongos Miceliales y de Levaduras del Departamento de Micología.

Todas las especies fueron identificadas fenotípicamente, y cuando fue necesario se recurrió a la identificación genotípica^{5,12,15,28}.

Extracción y purificación de ADN

Para estandarizar la PCR a las condiciones de nuestro laboratorio se utilizó ADN purificado de las cepas Downs y 073061, esta última aislada de un paciente argentino con histoplasmosis. El ADN se obtuvo a partir de un cultivo con agitación por 72 h en 100 mL de caldo GYE (glucosa 2%, extracto de levadura 1%) a 36 °C. A partir de allí se siguió el protocolo de Möller et al²⁰ modificado. Brevemente, las células fúngicas se separaron por centrifugación, se lavaron con buffer TES (0,1 M TRIS-CIH pH=8,0; 10 mM EDTA pH=8,0; 10 mM de DTT) y se resuspendieron en solución de lisis (TES-SDS 2%). Se trituraron mecánicamente por agitación en vórtex con esferas de vidrio de 500 µm de diámetro. Se agregó proteína K (concentración final 100 µg/mL) y se incubó durante 1 h a 55 °C. Posteriormente, se realizó una extracción fenólica, el ADN se purificó por tratamiento con RNasa (100 µg/mL) y proteinasa K (0,2 mg/mL) y se repitió la extracción fenólica. El ADN se resuspendió en agua y se conservó a –20 °C hasta su uso.

Tabla 1

Especies fúngicas analizadas utilizando ADN purificado y extracto acuoso.

Especie ^a	n	PCR positiva a partir de	
		Extrato acuoso ^b	ADN purificado ^c
<i>Histoplasma capsulatum</i>	248	239	248
<i>Chrysosporium</i> spp. ^d	5	0	0
<i>Emmonsia crescens</i>	2	2	2
<i>Renispora flavissima</i>	1	0	0
<i>Sepedonium</i> sp. ^e	1	0	0
<i>Coccidioides posadasii</i>	4	0	0
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	4	0	0
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1	0	0
<i>Sporothrix schenckii</i>	2	0	0
<i>Trichophyton</i> spp.	2	0	0
<i>Microsporium</i> spp.	2	0	0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	0	0
<i>Aspergillus</i> sp.	15	0	0
<i>Candida</i> spp.	13	0	0
<i>Cryptococcus</i> spp.	12	0	0
<i>Trichosporon</i> sp.	1	0	0
Otras levaduras	2	0	0

^a La identificación se realizó por métodos fenotípicos y en algunos casos se complementó con métodos moleculares.

^b Sensibilidad 96%, especificidad 97%, valor predictivo positivo (VPP): 99%, valor predictivo negativo (VPN): 88%.

^c Sensibilidad 100%, especificidad 97%, VPP: 99,2%, VPN: 100%.

^d Especies incluidas: *Chrysosporium keratinophilum*, *C. anamorfo* *Renispora*, *C. indicum*, *C. queenslandicum*.

^e Se observó una banda de 207 pb con el primer MSP1F-MSP1R. La secuenciación de esta banda en el análisis con BLAST no mostró similitud con ninguna secuencia depositada en el GenBank.

Los ácidos nucleicos de *Emmonsia crescens*, *Sepedonium* sp., *Chrysosporium* spp. y *Renispora flavissima* se extrajeron especialmente para este estudio. El inóculo inicial de 10^5 - 10^6 conidios se preparó a partir de un cultivo de 7 días en PDA (extracto acuoso de papa con glucosa al 30%, agar 1,5%). Cinco mililitros de este inóculo se trasvasaron a caldo PYG (peptona 2%, glucosa 2%, extracto de levadura 1%) y se incubó en agitación a 120 rpm durante 48 h a 28 °C. El micelio obtenido se separó por filtración, se lavó con agua destilada estéril y se liofilizó. Una porción del micelio liofilizado se colocó en un tubo tipo Eppendorf y se trituró con un pistillo. Se le agregó solución de lisis (0,05 M TRIS-ClH pH=8,0; 0,05 M EDTA pH=8,0; SDS 3%; beta mercaptoetanol 1%) y se incubó durante 1 h a 65 °C. Posteriormente, el ADN se extrajo y se purificó como se indica en el párrafo anterior.

Lisados de cultivos sin purificar

Como fuente de ADN de la reacción de PCR se utilizaron los lisados de los cultivos sin purificar, obtenidos por tratamiento con calor/frío de micelio y/o levadura. Brevemente, se colocaron aproximadamente 100 mg de levadura y/o micelio en un 1 mL de agua Milli Q. La suspensión se calentó en baño a 100 °C durante 5 min y se enfrió rápidamente en hielo (0 °C). Este proceso se repitió tres veces. Se dejó reposar 10 min y se separó el sobrenadante.

Reacción de PCR

Se utilizaron los primers diseñados por Guedes et al⁸; estos reconocen un fragmento específico del gen que codifica para el antígeno M de *H. capsulatum*. El par Msp1F (ACA AGA GAC GAC GGT AGC TTC ACG) y Msp1R (GCG TTG GGG ATC AAG CGA TGA GCC) origina una banda de 111 pb, y el Msp2F (CGG GCC GCG TTT AAC AGC GCC) y Msp2R (ACC AGC GGC CAT AAG GAC GTC) una banda de 279 pb. Los primeros se emplearon en dos reacciones independientes.

Para evaluar la utilidad de los lisados acuosos como fuente de ADN para la prueba de PCR se utilizaron las cepas Downs y 073061 como controles positivos y la cepa de *R. flavissima* (073100) como control negativo.

Las 248 cepas de *H. capsulatum* y las 68 de otras especies fúngicas se evaluaron usando como fuente de ADN de la reacción el lisado acuoso de los cultivos. En cada reacción de PCR se incluyó un control de inhibición; para ello cada prueba se realizó por duplicado y a uno de los tubos se le agregó 1 µL de ADN purificado de *H. capsulatum* (5 ng/µL). Cuando el resultado de alguna PCR fue negativo en el control de inhibición; se repitió la PCR utilizando ADN purificado del aislamiento correspondiente. Además, se evaluaron los ácidos nucleicos purificados de las especies diferentes de *Histoplasma*.

Interpretación y análisis de resultados

La presencia de una o ambas bandas fue indicativo de *H. capsulatum*. En los casos en que se obtuvieron productos de amplificación de las cepas diferentes de *H. capsulatum*, éstos se purificaron con PureLink PCR Purification kit (Invitrogen Life-Technologies, CA, EE.UU.) y se secuenciaron las bandas para ambas hebras. Utilizando el programa BLAST se buscó la homología de las secuencias con las depositadas en GenBank y con las secuencias de los productos de amplificación obtenidos de la cepa Downs y dos cepas autóctonas de *H. capsulatum* (062776 y 073061).

Los resultados fueron volcados a una tabla de dos por dos y se analizó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

Condiciones de bioseguridad

La manipulación de los hongos se realizó según recomendaciones del CDC⁴. La identificación presuntiva de los primocultivos de hongos dimórficos (observación de las características microscópicas y obtención de lisados de cultivos para PCR), así como la extracción y purificación de ácidos nucleicos se realizó en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 (BSL2) dentro de una cabina de seguridad biológica clase II. La propagación y manipulación de cultivos para las pruebas de dimorfismo y producción de exoantígenos de *H. capsulatum* y otros hongos dimórficos se realizó en BSL3.

Resultados

Las reacciones de PCR presentaron las bandas de 111 y 279 pb a partir de los ácidos nucleicos purificados y de los lisados acuosos sin purificar de las cepas Downs y 073061. Las reacciones realizadas a partir del ADN purificado y del lisado acuoso de *R. flavissima* (073100) resultaron negativas.

Ambas técnicas de PCR realizadas sobre los lisados acuosos fueron positivas para 239 de las 248 cepas de *H. capsulatum* (sensibilidad 96%) (tabla 1). Los lisados acuosos que no produjeron amplificados por PCR correspondieron a 9 cepas; tres eran de años recientes (2005 en adelante) y las seis restantes tenían una larga historia en la colección de cultivos e incluían dos cepas de referencia (G186B y G217B). La sensibilidad aumentó al 100 % cuando se repitió la metodología con el ADN purificado de estas 9 cepas.

Entre las 68 especies diferentes de *H. capsulatum* evaluadas, 66 no produjeron amplificados ni a partir de los lisados acuosos ni a partir del ADN purificado (especificidad 97%). Dos cepas de *E. crescens* (083307 y 062869) presentaron las bandas de 111 y 279 pb, y una cepa de *Sepedonium* sp. una banda de ≈ 200 pb con el primer MSP1F-MSP1R.

Las secuencias de las bandas de 111 y 279 pb de las cepas de *E. crescens* tuvieron una homología mayor al 97% cuando fueron comparadas en BLAST, con la secuencia de *H. capsulatum* depositada en el GenBank (AF026268.2). Una homología similar se observó con los fragmentos secuenciados de la cepa Downs, 062776 y 073061 (fig. 1). La secuencia de la banda de *Sepedonium* sp. resultó de 207 pb, y en el análisis con el programa BLAST no mostró similitud con ninguna secuencia depositada en el GenBank ni con las bandas de las cepas de *H. capsulatum* secuenciadas en este estudio. Esta reacción fue considerada negativa.

El tiempo consumido desde la obtención del lisado acuoso hasta la visualización de los productos amplificados varió entre 5 y 7 h.

Las técnicas de PCR evaluadas sobre los lisados acuosos tuvo un VPP de 99% y un VPN de 88%. Cuando se utilizó ADN purificado el VPP se mantuvo en un valor similar: 99,2%, mientras que el VPN aumentó a 100%.

En 85 de las 248 cepas de *H. capsulatum* se realizaron las técnicas de PCR a partir del lisado de cultivo sin purificar antes de identificarlas morfológica y fisiológicamente. En estas cepas se documentaron los tiempos de termoconversión y de producción de exoantígenos. La termoconversión insumió en promedio 72 días (mediana de 40 días) y la producción de exoantígenos 60 días (mediana de 45 días). En este grupo de aislamientos, 3 tuvieron micelio estéril, uno produjo el exoantígeno a los 52 días y la termoconversión insumió 35 subcultivos (más de un año). En otras dos cepas la termoconversión fue incompleta hasta el momento en que finalizó este estudio.

Discusión

El diagnóstico de la histoplasmosis requiere el aislamiento y la identificación de *H. capsulatum* a partir de los cultivos de especímenes clínicos³. Las técnicas clásicas de identificación conllevan

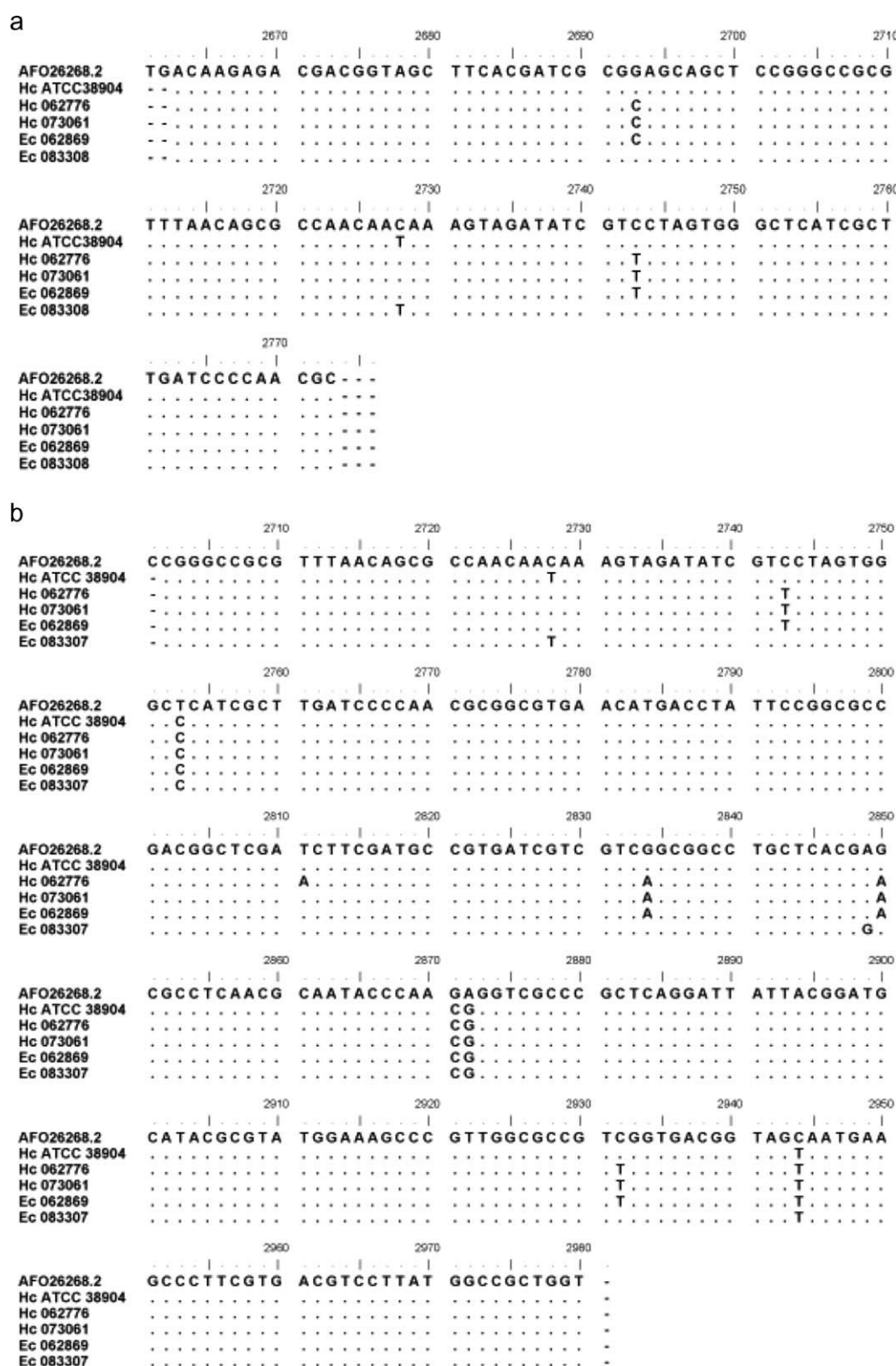


Figura 1. Secuencias de las bandas de 111 (a) y de 279 pb (b) de *H. capsulatum* (Hc): cepa ATCC 38904 (Downs), dos cepas clínicas autóctonas (062776 y 073061) y de las cepas de *E. crescens* (Ec) (062869 y 083307). Estas secuencias están comparadas con la secuencia AF026268.2, depositada en Gen Bank.

tiempos de hasta 4 semanas debido al lento desarrollo del hongo en los medios de cultivo³ y demandan trabajar en BSL3⁴.

El método aquí evaluado es económico, de fácil implementación y permite la identificación rápida de *H. capsulatum* a partir de lisados de cultivos. En coincidencia con los autores que describieron inicialmente las técnicas de PCR⁸, los dos sistemas produjeron

resultados equivalentes, lo que confirma que la presencia de una de las bandas es suficiente para identificar presuntivamente *H. capsulatum*. En nuestro estudio, ninguno de los dos sistemas de PCR ensayados permitió diferenciar las cepas de *E. crescens* de las de *H. capsulatum*; inclusive, en el análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados (fig. 1). En estudios complementarios,

enfrentando el antígeno de las dos cepas de *E. crescens* con suero anti-*Histoplasma* (IMMY H60110 Immuno Mycologics, Norman, OK, EE.UU.) se formaron bandas de identidad parcial en las pruebas de inmunodifusión (datos no mostrados). No sabemos si otras especies genéticamente relacionadas a *H. capsulatum*, no incluidas en este trabajo, son capaces de producir las bandas de amplificación con los primers ensayados. Probablemente sea necesario investigar un número mayor de cepas de especies relacionadas con el género *Emmonsia*. Las cepas de *E. crescens* aquí analizadas fueron aisladas: una de una biopsia perianal de un paciente HIV positivo (062869), y la otra de un lavado broncoalveolar (083307). Ambas fueron identificadas sin inconvenientes por su morfología y la presencia de adiasporas en los cultivos a 36 °C. Es importante considerar en este punto que, si bien la adiaspiromicosis y la histoplasmosis presentan cuadros clínicos similares, la enfermedad provocada por *E. crescens* es extremadamente rara en humanos, y tanto en el tejido como en cultivos a 36 °C produce adiasporas⁵. Otros autores observaron reacciones cruzadas entre especies utilizando métodos moleculares. Dot et al⁶ utilizaron ADN de *H. capsulatum* como control positivo de una reacción de PCR para diagnosticar una adiaspiromicosis. La reacción de PCR positiva en las cepas de *E. crescens* probablemente se deba a que el agente de la adiaspiromicosis y el de la histoplasmosis son ascomicetes. Ambos géneros tienen un estado teleomorfo en el género *Ajellomyces* (Onygenaceae, Onygenales) y comparten un ancestro común evolutivamente cercano^{5,22,26}.

Valores del 100% de sensibilidad y especificidad fueron referidos por otros autores que trabajaron sobre lisados de cultivos de *H. capsulatum* sin purificar utilizando PCR en tiempo real basándose en dianas ITS¹⁹, sin embargo, estos autores no detallan si incluyeron cepas de *E. crescens* en su estudio.

A partir de 2005, los aislamientos que llegaron al laboratorio como presuntos hongos dimórficos fueron analizados por la metodología aquí descrita. Cuatro aislamientos no arrojaron amplificados por PCR y posteriormente se identificaron como *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus* sp. y *R. flavissima*; estas cepas están incluidas como control de especificidad en la tabla 1.

Otros tres aislamientos de pacientes con sospecha de histoplasmosis y cultivo con micelio estéril dieron como primer resultado indicativo de *H. capsulatum* amplificados por PCR a partir del lisado; estos resultados fueron confirmados en un tiempo superior a los 30 días por termoconversión y producción de exoantígenos.

Otros métodos rápidos de identificación como el AccuProbe *Histoplasma* requiere instrumental específico, a lo que se suma el elevado coste del reactivo¹¹. Por su parte, el análisis de las secuencias ITS, consideradas dianas específicas y eficaces para identificar hongos patógenos como *Histoplasma*^{12,13}, requiere equipos de secuenciación. Muchos centros asistenciales de mediana y alta complejidad cuentan con BSL2 con cabinas de seguridad biológica clase II y están aptos para manejar primocultivos de *Histoplasma*. En estos laboratorios, la metodología aquí descrita puede convertirse en un método alternativo, ya que en general cuentan con laboratorios de biología molecular, pero no cuentan con servicio de secuenciación para utilizar las dianas ITS.

Entre las ventajas del método aquí propuesto destacamos que solo necesita un termociclador convencional, reduce los tiempos de identificación (5-7 horas), y en consecuencia reduce los costes de la determinación. Aun teniendo que obtener ADN purificado, el método es ventajoso puesto que se extendería a no más de 6 días entre el desarrollo del hongo y la extracción de ADN. Es importante recalcar que aunque el VPP se mantuvo, la sensibilidad y el VPN aumentaron al 100% cuando se utilizó ADN purificado.

Independiente de la edad del cultivo, la fase de desarrollo utilizada, la contaminación bacteriana asociada y el medio de cultivo (algunos extractos acuosos se obtuvieron a partir de *H. capsulatum* crecido en el medio de Lowenstein Jensen) las reacciones de

PCR a partir de los lisados acuosos de cultivos sin purificar permitieron identificar *H. capsulatum* con muy buena sensibilidad y especificidad.

El método aquí ensayado se propone como una alternativa al AccuProbe *Histoplasma* y a la secuenciación de ITS, para aquellos laboratorios con presupuestos limitados, que poseen termociclador pero no tienen acceso a equipos de secuenciación. Aunque las reacciones cruzadas con *Emmonsia* podrían ser una limitación, la identificación de esta especie a partir de materiales clínicos no es dificultosa. Es importante tener en cuenta que, según los criterios vigentes, la identificación definitiva de *H. capsulatum* requiere de la termoconversión dimórfica y/o la detección de exoantígenos específicos en el sobrenadante del cultivo^{2,16}.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Viviana Ritacco las sugerencias realizadas durante la elaboración de este manuscrito.

Bibliografía

1. Beguin H, Larcher G, Noland N, Chabasse D. *Chrysosporium chiropterorum* sp. nov., isolated in France, resembling *Chrysosporium* state of *Ajellomyces capsulatus* (*Histoplasma capsulatum*). Med Mycol. 2005;43:161-9.
2. Brandt ME, Gaunt D, Iqbal N, McClinton S, Hambleton S, Sigler L. False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe chemiluminescent test result caused by a *Chrysosporium* species. J Clin Microbiol. 2005;43:1456-8.
3. Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006;25:665-8.
4. Center for Disease Control and Prevention and National Institute of Health. CDC-NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 2007; 5th Ed [citado 10-03-2010]. Disponible en: www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMbl_5th_Edition.pdf.
5. De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ, editors. Atlas of Clinical Fungi. 3rd ed. CD version. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2009.1.
6. Dot JM, Debourgogne A, Champigneulle J, Salles Y, Brizion M, Puyhardy JM, et al. Molecular diagnosis of disseminated adiaspiromycosis due to *Emmonsia crescens*. J Clin Microbiol. 2009;47:1269-73.
7. Gaur PK, Lichtwardt RW. Comparative study of a new *Chrysosporium* species with *Histoplasma capsulatum*. Sabouraudia. 1980;18:105-14.
8. Guedes HL, Guimaraes AJ, Muniz M de M, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. J Clin Microbiol. 2003; 41:535-539.
9. Gugic D, Cleary T, Vincek V. *Candida glabrata* infection in gastric carcinoma patient mimicking cutaneous histoplasmosis. Dermatol Online J. 2008;14:15.
10. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. J Clin Microbiol. 1992;30:3003-4.
11. Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. J Clin Microbiol. 1993;31:419-21.
12. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol. 2002;40:87-109.
13. Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, Smith JW, Wheat LJ, Connolly PA, et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. J Clin Microbiol. 2000;38:241-5.
14. Kauffman CA. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. Clin Microbiol Rev. 2007;20:115-32.
15. Kurtzman CP, Fell JW. In: Kurtzman CP, Fell JW, editors. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4th edition Amsterdam: Elsevier; 1998. p. 1-1055.
16. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. En: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editors. *Medical Mycology*. Philadelphia-London: Lea & Febiger; 1992. p. 464-513.
17. Lacaz CD, del Negro GM, Vidal MS, Heins-Vaccari EM, Santos RF, Martins MA, et al. Atypical disseminated cutaneous histoplasmosis in an immunocompetent child, caused by an "aberrant" variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999;41:195-202.
18. Lamps LW, Molina CP, West AB, Haggitt RC, Scott MA. The pathologic spectrum of gastrointestinal and hepatic histoplasmosis. Am J Clin Pathol. 2000;113:64-72.
19. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2003;41:1295-8.
20. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Res. 1992;20:6115-6.

21. Morris PR, Terreni AA, DiSalvo AF. Red-pigmented *Histoplasma capsulatum*-an unusual variant. J Med Vet Mycol. 1986;24:231–3.
22. Peterson SW, Sigler L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. J Clin Microbiol. 1998;36: 2918–25.
23. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. J Clin Microbiol. 2006;44:2977–82.
24. Sandin RL, Isada CM, Hall GS, Tomford JW, Rutherford I, Rogers AL, et al. Aberrant *Histoplasma capsulatum*. Confirmation of identity by a chemiluminescence-labeled DNA probe. Diagn Microbiol Infect Dis. 1993;17:235–8.
25. Stockman L, Clark KA, Hunt JM, Roberts GD. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Histoplasma capsulatum*. J Clin Microbiol. 1993;31:845–50.
26. Sugiyama M, Summerbell RC, Mikawa T. Molecular phylogeny of Onygenalean fungi based on small subunit (SSU) and large subunit (LSU) ribosomal DNA sequences. Stud Mycol. 2002;47:5–23.
27. Sutton DA, Padhye AA, Standard PG, Rinaldi MG. An aberrant variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. J Clin Microbiol. 1997;35:734–5.
28. Van Oorschot CAN. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. Stud Mycol. 1980;20:1–89.
29. Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. *Histoplasma capsulatum* con morfología aberrante en Argentina. Rev Argent Microbiol. 2006;38:79–83.