

Utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la histoplasmosis

María Guadalupe Frías De León¹, María Lucía Taylor²
Aurora Hernández-Ramírez¹, María del Rocío Reyes-Montes¹

Laboratorios de ¹Micología Molecular y de ²Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF, 04510, México

Utility of molecular techniques in the diagnosis of histoplasmosis

Abstract. Histoplasmosis is a systemic mycosis distributed worldwide, associated to birds and bats guano. Diagnosis is achieved through the isolation of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in clinical samples and complemented with immunodiagnostic procedures; however, both isolation and immunodiagnosis pose limitations, such as the slow growth of the fungus to perform the mycological diagnosis and the immune cross-reaction with other fungal species causing similar nosologies. These handicaps have demanded more efficient methods to detect accurately the presence of the pathogen in infected individuals. Recently, molecular tests have been introduced to reveal small amounts of genetic material of the fungus in clinical samples. For the detection of *H. capsulatum*, hybridization techniques of the fungal DNA through Southern blot and in solution have been developed, as well as Polymerase Chain Reaction (PCR) with an adequate probe. PCR is the most used technique, because it facilitates a sensitive and fast diagnosis. Although these techniques have been widely accepted in the clinical practice, they also present handicaps that have not allowed replacing the classical techniques used in the mycology laboratory. Therefore, it is recommended to combine both techniques to ensure an accurate diagnosis.

Key words: *Histoplasma capsulatum*, diagnosis, PCR, molecular techniques.

Resumen. La histoplasmosis es una micosis sistémica de amplia distribución mundial, asociada a guano de aves y murciélagos. El diagnóstico se realiza por el aislamiento de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* en las muestras clínicas y se complementa con procedimientos de inmunodiagnóstico; sin embargo, tanto el aislamiento como el inmunodiagnóstico tienen limitaciones, como son el crecimiento lento del hongo para realizar el diagnóstico micológico y las reacciones inmunes cruzadas con otras especies de hongos causantes de nosologías similares. Tales inconveniencias han demandado métodos más eficientes para asegurar la presencia del patógeno en sujetos infectados. Recientemente, se han introducido las pruebas moleculares para revelar pequeñas cantidades de material genético del hongo en muestras clínicas. Para la detección de *H. capsulatum* se han utilizado hibridaciones del DNA fúngico por Southern blot y en solución, asimismo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con una sonda adecuada. La PCR es la más empleada, ya que favorece un diagnóstico sensible y rápido. Aunque estas técnicas alcanzaron un gran impacto en la práctica clínica, también presentan inconvenientes que no las permiten desplazar a las técnicas clásicas utilizadas en el laboratorio de Micología. Se recomienda la combinación de ambas para alcanzar la seguridad de un diagnóstico certero.

Palabras clave: *Histoplasma capsulatum*, diagnóstico, PCR, técnicas moleculares.

Received 18 October 2007; accepted 27 November 2007.

Recibido 18 de octubre 2007; aceptado 27 de noviembre 2007.

Autor para correspondencia: María del Rocío Reyes -Montes
remo@servidor.unam.mx

Introducción

La histoplasmosis es adquirida por la inhalación de microconidios y fragmentos de hifas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, un hongo dimórfico que se desarrolla en forma micelial a temperatura ambiente y en forma de levadura en tejidos infectados. La mayoría de las infecciones no son clínicamente reconocidas, por lo que en ocasiones se identifican accidentalmente por hallazgos radiográficos o patológicos. En general, los casos sintomáticos son leves y se resuelven sin necesidad de terapia antifúngica.

En México, la prevalencia de esta micosis es elevada debido al incremento de pacientes con inmunosupresión por varias causas, incluyendo el SIDA, y por la gran ubicuidad del hongo, ya que éste ha sido registrado tanto en lugares cerrados (cuevas, minas, etcétera) como en lugares abiertos (parques, avenidas, etcétera) que definen áreas de alto y bajo riesgo de adquisición de la infección [26-28].

El diagnóstico de la histoplasmosis se realiza con base en los resultados de la evaluación clínica cuidadosa y de diversas pruebas de laboratorio. Entre las pruebas diagnósticas se incluyen: el cultivo, la tinción del hongo en tejidos y fluidos corporales, así como pruebas para la detección de anticuerpos y de antígenos. El éxito de cada prueba varía con la extensión y severidad de la infección.

La identificación definitiva de *H. capsulatum* requiere: la demostración de macroconidios tuberculados y microconidios en cultivos a 25-28 °C; la conversión de fase micelial a levaduriforme en cultivos a 37 °C; y la producción de exoantígenos. A pesar de sus grandes ventajas, este procedimiento es muy lento y los resultados no son inmediatos debido al tiempo prolongado que requiere *H. capsulatum* para desarrollarse (entre 1 y 3 semanas) [12, 17]. Asimismo, sus conidios pueden confundirse morfológicamente con algunos producidos por hongos

pertenecientes a otros géneros, tales como *Chrysosporium*, *Sepedonium* y *Renispora* [12, 27]. Además, el proceso de conversión *in vitro* a la fase levaduriforme es lento y laborioso, requiere con frecuencia de múltiples subcultivos y no siempre es exitoso. Los exoantígenos del hongo [10], se obtienen tanto de la fase micelial como de la levaduriforme y los más característicos son los denominados antígenos H y M. Aunque la producción de los exoantígenos H y M es una buena opción diagnóstica, el trabajar con ellos requiere experiencia y un tiempo de incubación largo, antes de la obtención de los mismos.

No obstante que las pruebas serológicas son muy útiles para el diagnóstico en pacientes con infección moderada a grave, los anticuerpos requieren cuando menos 15-20 días para ser detectables después de la exposición inicial al patógeno. La utilidad de estas pruebas varía con el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad [31].

La detección de antígeno en diferentes fluidos biológicos, es el método de inmunodiagnóstico más rápido en los casos de histoplasmosis diseminada; sin embargo, se puede presentar cruce reactivo con antígenos similares de otros hongos como, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium marneffeii* y *Blastomyces dermatitidis* [32].

En la mayoría de las pruebas de laboratorio que se usan para identificar a *H. capsulatum* (tinciones para hongos, detección de antígenos circulantes o en tejidos infectados e inmunoensayos con anticuerpos) se presentan resultados falsos positivos, por lo que es importante correlacionar el resultado de las pruebas con la evolución clínica del paciente.

Por las inconveniencias referidas, es necesario emplear métodos que permitan investigar rápidamente la presencia del hongo, especialmente en el caso de la histoplasmosis invasiva. Actualmente, para cubrir las limitaciones de los métodos tradicionales, se emplean los moleculares como pruebas confirmatorias para detectar e identificar *H. capsulatum*; entre ellos las hibridaciones tipo Southern y en solución, así como la Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR). La PCR es la técnica molecular más utilizada en la práctica diagnóstica, amplifica DNA fúngico a partir de una pequeña cantidad del patógeno en muestras clínicas, y constituye un rápido, además de sensible procedimiento para el diagnóstico de la histoplasmosis. La PCR para la detección e identificación de *H. capsulatum* se ha desarrollado en diferentes modalidades: en un sólo paso, anidada, tiempo real y la PCR-Acoplada a Ensayos Inmunoenzimáticos (PCR-EIA).

Hibridación tipo Southern

Este método se aplicó principalmente en el estudio epidemiológico de *H. capsulatum* y la sonda utilizada, obtenida del gen *YPS3* el cual sólo se expresa en la fase levaduriforme del hongo, detecta fragmentos polimórficos de diferentes aislados clínicos del hongo, obtenidos por tratamiento del DNA genómico con enzimas de restricción, lo que ha permitido lograr diferencias intrínsecas entre los aislados y clasificarlos de acuerdo con su origen geográfico [11]. A pesar de ser un método sensible, no es recomendable para el diagnóstico de la histoplasmosis, ya que su utilización con material de biopsia no garantiza que la muestra contenga la cantidad (10 µg) adecuada de DNA del patógeno requerida para el análisis. Además, para introducir su uso en los laboratorios de Micología Clínica, es necesario llevar a cabo un análisis costo-beneficio.

Hibridación en solución

Es el método más empleado con las sondas comerciales Accuprobe, diseñadas por Gen Probe (Gen Probe Inc., San Diego, CA) para la identificación de aislados de *H. capsulatum*. Varios estudios comparativos [8, 9, 19, 23, 24] han demostrado que estas sondas son sensibles, aunque no totalmente específicas de *H. capsulatum*, puesto que se ha reportado cruce con bacterias y hongos [4]. Además, se han observado resultados falsos positivos ocasionados por la presencia de bacterias en los cultivos y por interferencia en la

lectura de la quimioluminiscencia, provocada por la sangre de carnero presente en los medios de cultivo [24]. Los errores de lectura se deben a que la detección de híbridos entre la sonda y la secuencia blanco se realiza en un luminómetro, aparato de alta sensibilidad. Este método tiene dos desventajas, una es la vida media corta de las sondas quimioluminiscentes (5 meses) y la otra la dificultad de adquirir un luminómetro, el cual tiene un costo elevado. Asimismo, el uso de las Accuprobe en la detección directa de *H. capsulatum* en muestras clínicas no ha sido reportada.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica, en sus diferentes modalidades, se ha usado en la práctica clínica para la identificación de aislados de *H. capsulatum*, así como para la detección del hongo en especímenes clínicos y muestras de suelo. La sensibilidad de este método es su gran ventaja, logra detectar hasta 1 fg (fentogramo) de DNA del hongo, pero paradójicamente también es su desventaja más importante, ya que la mínima contaminación de las muestras con productos previamente amplificados genera falsos positivos en posteriores amplificaciones. A continuación se refieren datos de distintos métodos derivados de la PCR empleados en el diagnóstico de la histoplasmosis.

PCR en un sólo paso

Una modalidad de PCR en un sólo paso ha sido publicado para la detección de *H. capsulatum*, donde se diseñó una sonda con base en la secuencia del gen que codifica para el antígeno inmunodominante M [15]. La PCR identificó las tres variedades taxonómicas de *H. capsulatum* (*capsulatum*, *duboisii* y *farciminosum*) y fue reportada como sensible y específica. Sin embargo, nuestra experiencia de trabajo con esta sonda utilizándola como herramienta de diagnóstico molecular de histoplasmosis, en muestras clínicas procedentes de pacientes con sospecha de la enfermedad, hace cuestionar su especificidad debido a que la sonda reveló

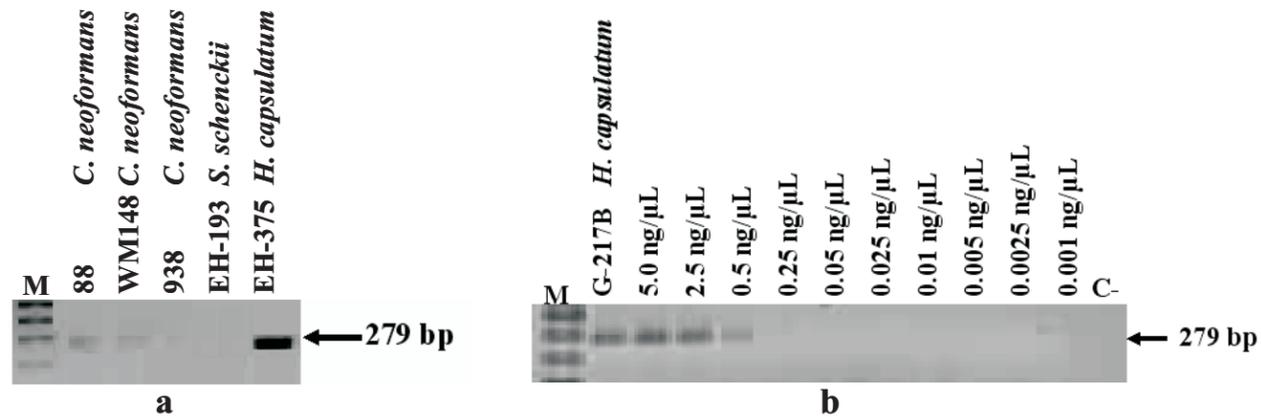


Figura 1. Detección de la especificidad y sensibilidad de la sonda diseñada a partir del antígeno M. El ensayo se llevó a cabo con los oligonucleótidos reportados por Matos-Guedes *et al.* [15]. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio. (a) Especificidad: En el primer carril se colocó el marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA Ladder; en el segundo, tercero y cuarto carril se colocaron los productos de amplificación de las cepas 88, WM148 y 938 de *C. neoformans*, respectivamente; en el quinto carril el producto de amplificación de la cepa EH-193 de *S. schenckii*; y en el sexto carril el producto de amplificación de un aislado de *H. capsulatum*. (b) Sensibilidad: Se amplificaron concentraciones variables del DNA de la cepa de referencia G-217B de *H. capsulatum* de Estados Unidos de América. M: 100 bp DNA Ladder. C: control negativo con agua.

reacción positiva con DNA de *Cryptococcus neoformans* (Figura 1a). Tal hallazgo se confirmó al aislarse *C. neoformans* de la muestra clínica, asimismo se observó cruce con un DNA obtenido de células procedentes de individuos sanos (datos no mostrados). Además, al utilizar la sonda para identificar *H. capsulatum* en muestras de suelo no fue reproducible la sensibilidad reportada de 1 pg (0.001 ng/μl) de DNA, puesto que no detecta concentraciones menores a 0.5 ng/μl (Figura 1b). Otra PCR en un sólo paso fue desarrollada por Pounder *et al.* [20] quienes probaron un kit comercial que utiliza la amplificación de secuencias repetitivas con oligonucleótidos específicos para la identificación de *H. capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *B. dermatitidis*. Este sistema no resultó funcional para *H. capsulatum*, debido a la gran variabilidad genética que existe dentro de la especie.

PCR anidada

El problema de reacciones inespecíficas que se presentan en algunos ensayos de PCR puede eliminarse con una PCR anidada, es decir, hacer una segunda reacción de PCR, con un par de oligonucleótidos nuevos que se alinien dentro del

primer fragmento amplificado, dando lugar a fragmentos más cortos pero más específicos. Para la identificación de *H. capsulatum* se han propuesto dos ensayos que son muy específicos y sensibles, gracias a que están diseñados con base en fragmentos génicos únicos de *H. capsulatum*, correspondientes al gen del antígeno H [3] y al gen que codifica para una proteína coactivadora de 100 kDa que tiene un papel esencial en la supervivencia de *H. capsulatum* en células humanas [1]. Aunque el gen de la proteína de 100 kDa está presente en el genoma de mamíferos, éste fue acotado en su secuencia para seleccionar un fragmento específico del hongo. Ambas sondas han sido exitosamente valoradas por los respectivos autores en muestras clínicas de pacientes con diagnóstico confirmativo de histoplasmosis.

Distintos autores han utilizado la PCR anidada diseñando oligonucleótidos con base en la secuencia de DNA que codifica para genes ribosomales altamente conservados dentro del reino de los hongos (PCR panfúngica) [30]. En el primer paso de la PCR panfúngica se amplifican los genes ribosomales de cualquier hongo en una muestra clínica y en el segundo paso se lleva a cabo la identificación específica del hongo posiblemente asociado al cuadro clínico del paciente

[21, 22]. Ueda *et al.* [29] y Murata *et al.* [18] reportaron, con buenos resultados, una PCR anidada para el diagnóstico de histoplasmosis canina en Japón, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de regiones específicas para *H. capsulatum* del gen rRNA. Sandhu *et al.* [22] describieron una sonda con base en el gen 28S del rRNA que detecta cualquier hongo patógeno o saprobio en la primera PCR, mientras que para la segunda PCR emplearon oligonucleótidos específicos de *H. capsulatum* para revelar la presencia de éste en muestras clínicas. Reid *et al.* [21] diseñaron sondas para PCR anidada a partir de las regiones ITS (internal transcriber spacers) y 5.8S del rRNA que permitieron de manera rápida (2 días) y efectiva la detección de *H. capsulatum* en muestras de suelo y guano.

No obstante que la PCR anidada es un método muy sensible y específico, conlleva diversos problemas, entre ellos, la amplificación inespecífica de la contaminación de los primeros productos de reacción durante su manipulación. Esto ha sido demostrado por Bialek *et al.* [2], quienes encontraron amplificaciones inespecíficas aun bajo condiciones de alta astringencia (elevada temperatura de alineamiento).

PCR en tiempo real (PCR-TR)

Este método que es cuantitativo y rápido fue valorado con la confirmación de aislamientos de *H. capsulatum* obtenidos a partir del cultivo de muestras clínicas [14]. Martagon-Villamil *et al.* [14], lo definen como 100 % sensible y específico para *H. capsulatum*, no mostrando cruces con otros hongos que presentan mimetismo morfológico (*Candida glabrata*, *Sporothrix schenckii* y *P. marneffeii*), ni con aquellos genéticamente relacionados (*B. dermatitidis*). Buitrago *et al.* [5, 6] valoraron la utilidad de la PCR-TR para el diagnóstico de histoplasmosis en muestras clínicas, diseñando oligonucleótidos a partir de secuencias de las regiones ITS del gen rRNA y mostraron que es un método sensible y específico para el diagnóstico rápido de histoplasmosis, sobre todo en muestras respiratorias y aspirados de médula ósea. Aunque la

sensibilidad de la PCR-TR en muestras de sangre es inferior, puede ser complementada con el cultivo y la serología, particularmente, en enfermos VIH positivos. Sin embargo, se necesita comparar este método con otros ya establecidos para determinar su utilidad como prueba diagnóstica, especialmente en los casos de histoplasmosis en zonas no endémicas. La mayor ventaja de la PCR-TR es la posibilidad de monitorear el estado clínico del paciente mediante la evaluación de la carga fúngica después de la aplicación de un tratamiento antifúngico, pero en el caso de la histoplasmosis no se ha reportado ningún ensayo al respecto. La desventaja de esta modalidad de PCR es que el equipo necesario para realizarla es muy costoso y por lo tanto no es accesible a los laboratorios rutinarios de práctica diagnóstica.

PCR-EIA

Inicialmente este método se ha empleado para identificar, con excelentes resultados, hongos de importancia médica que presentan morfología levaduriforme *in vivo*, utilizando para esto, sondas de las regiones intergénicas ITS1, ITS2 e ITS3 del rRNA [13]. Asimismo, Tang *et al.* [25] diseñaron una sonda a partir del gen rRNA para identificar la fase levaduriforme de *H. capsulatum* en orina y la sensibilidad de este método se comparó con el cultivo de las muestras clínicas y la ELISA para determinación de antígenos en orina. Sin embargo, la PCR-EIA fue menos efectiva que la detección de antígeno en orina, por lo que su uso en el diagnóstico de la histoplasmosis diseminada es limitado [25].

Discusión y conclusiones

A pesar del gran impacto de las técnicas moleculares en el campo de la Micología Clínica, éstas no eliminan el uso rutinario de las técnicas clásicas, y lo más recomendable en la práctica clínica micológica es el manejo simultáneo de ambas. Es importante destacar que los métodos moleculares

no han sido debidamente validados por comparación con aquellos utilizados en la identificación rutinaria de hongos, por lo que no son empleados en los laboratorios clínicos como herramientas seguras para el diagnóstico de la histoplasmosis. Tal circunstancia demanda una urgente validación para su uso sistemático en el diagnóstico y en diferentes tipos de investigación.

No obstante que las ventajas de los métodos moleculares son incuestionables, sus fallas deben ser consideradas con precisión, con fines a futuras correcciones y/o consideraciones para su mejor aplicación.

Entre los inconvenientes de los métodos moleculares, mencionaremos algunos que son elementales y factibles de solucionarse.

Tanto la PCR en un sólo paso como en la anidada, la identificación de *H. capsulatum* se realiza con base en el tamaño de los fragmentos génicos amplificados (amplicón) que se observa en el gel de agarosa. Sin embargo, cuando hay contaminación con otros organismos se pueden producir amplicones de tamaños semejantes, por lo que se recomienda secuenciarlos y compararlos con la secuencia original del fragmento génico que generó los oligonucleótidos utilizados en el ensayo. También se recomienda digerir los amplicones con enzimas de restricción y asegurarse de que éstos presenten el mismo patrón de restricción correspondiente al fragmento génico original del organismo en estudio, aunque esto incrementa el costo y tiempo requerido para el estudio.

Otro inconveniente es el uso frecuente de oligonucleótidos diseñados con base en la secuencia de genes ribosomales. A la fecha, el número y diversidad de las secuencias de las regiones intergénicas ITS en el Gen Bank son mayores que las depositadas para otros genes. Sin embargo, algunas de estas regiones sólo han sido parcialmente secuenciadas en hongos relacionados filogenéticamente, de tal manera que cuando se usan oligonucleótidos diseñados para un hongo en particular, a partir de secuencias del Gen Bank, se corre el riesgo de que las

regiones ITS amplificadas puedan ser compartidas por hongos afines. Tal situación, sucedió en un estudio que se realizó con la sonda Accuprobe de *H. capsulatum* diseñada a partir de las regiones ITS y 5.8S del rRNA, donde ésta amplificó un microorganismo que en su morfología macroscópica carecía de macroconidios tuberculados, no se convertía a levadura a 37 °C y soportaba altas temperaturas en fase micelial, características no compatibles con la mayoría de los aislados de *H. capsulatum*. Estudio adicional reveló que este microorganismo era positivo a la prueba de perforación de cabello, la cual está asociada a una actividad queratinolítica. Estas discrepancias condujeron a la secuenciación de la región que codifica para las regiones 18S y la 5.8S ITS-2 [16], lo que discriminó el cruce molecular de la sonda. La secuencia parcial 18S desplegó alta homología con *C. immitis*, mientras que la región ITS-2 (muy utilizada para estudios taxonómicos de especies) mostró homología con el microorganismo saprobio *Chrysosporium keratinophyllum*. Cabe mencionar que mientras no se hayan secuenciado los genomas de todos los organismos, siempre se correrá el riesgo de encontrar problemas de cruces moleculares al utilizar sondas diseñadas a partir de cualquier región genómica.

Es importante señalar que la identificación molecular es dependiente de la calidad de las secuencias depositadas en el Gen Bank. En muchos casos existen huecos en las secuencias que pueden conducir a resultados engañosos o difíciles de interpretar [20]. Por lo que, durante el diseño de los oligonucleótidos para una PCR de un microorganismo patógeno se debe revisar la taxonomía de la especie en estudio, con el propósito de observar con que especies existe una mayor relación filogenética y tener en cuenta si éstas son patógenos de humanos. Esto se ha vuelto muy necesario hoy día porque organismos antes considerados no patógenos son ahora reconocidos como agentes infecciosos de huéspedes inmunocomprometidos [4].

La prontitud diagnóstica posee un especial

significado, puesto que los resultados positivos tienen repercusión directa sobre las decisiones clínicas a adoptar en el inicio de una adecuada quimioterapia antifúngica o en el cambio de terapia durante el transcurso de la enfermedad. Por este motivo, se ha tratado de introducir una nueva estrategia molecular con la utilización de biochips en la práctica diagnóstica micológica. Los ensayos con biochips son elaborados con base en la hibridación de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en una muestra clínica con miles de oligonucleótidos que se encuentran fijados en un soporte de vidrio (biochips). Entre los oligonucleótidos de los biochips pueden encontrarse secuencias específicas para el diagnóstico de hongos patógenos, para la detección de mutaciones que confieren resistencias a antifúngicos o para la identificación de factores de virulencia de hongos, por lo que se podrían realizar todas las detecciones simultáneamente en un sólo biochip, simplificándose enormemente el diagnóstico [7].

Por último, hay que señalar que los médicos necesitan tener mayor conocimiento de las micosis, notificarlas y tomar en cuenta las evidencias epidemiológicas asociadas, pero sobre todo deben estar familiarizados con el uso y limitaciones de cada una de las pruebas diagnósticas que están disponibles para las enfermedades micóticas, en particular, para la histoplasmosis.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto DGAPA-UNAM-IN219703-2 financiado por esta institución.

Literatura citada

- Bialek, R., J. Fischer, A. Feucht, L.K. Najvar, K. Dietz, 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1506-1509.
- Bialek, R., A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nubling, V.J. Robertson, J. Knobloch, R. Hohle, 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1642-1647.
- Bracca, A., M.E. Tosello, J.E. Girardini, S.L. Amigot, C. Gómez, E. Serra, 2003. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1753-1755.
- Brandt, M.E., D. Gaunt, N. Iqbal, S. McClinton, S. Hambleton, L. Sigler, 2005. False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe chemiluminescent test result caused by a *Chrysosporium* species. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1456-1458.
- Buitrago, M.J., J. Berenguer, E. Mellado, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, 2006. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 25: 665-668.
- Buitrago, M.J., A. Gómez-López, A. Monzón, J.L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, 2007. Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25:16-22.
- Fodor, S.P.A., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, C.P. Holmes, C.L. Adams, 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364: 555-556.
- Hall, G.S., K. Pratt-Rippin, J.A. Washington, 1992. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 3003-3004.
- Huffnagle, K., R. Gander, 1993. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* Accuprobes. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 419-421.
- Kaufman, L., P.G. Standard, 1987. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Annual Review of Microbiology* 41: 209-225.
- Keath, E.J., E.D. Spitzer, A.A. Painter, S.J. Travis, G.S. Kobayashi, G. Medoff, 1989. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 2369-2372.
- Kwon-Chung, K.J., J.E. Bennett, 1992. *Medical Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Lindsley, M.D., S.F. Hurst, J.I. Nauren, C.J. Morrison, 2001. Rapid Identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3505-3511.
- Martagon-Villamil, J., N. Shrestha, M. Sholtis, C.M. Isada, G.S. Hall, T. Bryne, B.A. Lodge, L.B. Reller, G.W. Procop, 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1295-1298.
- Matos-Guedes, H.L., G.A. Jefferson, M.M. Medeiros, C.V. Pizzini, A.J. Hamilton, J.M. Peralta, G.S. Jr. Deepe, R.M. Zancopé-Oliveira, 2003. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 535-539.
- Millar, B.C., X. Jiru, J. Walker, J.P. Evans, J.E. Moore, 2003. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right?. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5778-5780.
- Morris, A.J., T.C. Byrne, J.F. Madden, L.B. Reller, 1996. Duration of incubation of fungal cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1583-1585.
- Murata, Y., A. Sano, Y. Ueda, T. Inomata, A. Takayama, N. Poonwan, M. Nanthawan, Y. Mikami, M. Miyaji, K. Nishimura, K. Kamei, 2007. Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Medical Mycology* 45: 233-247.
- Padhye, A., G. Smith, P. Standard., D. McLaughlin, L. Kaufman, 1994. Comparative evaluation of chemiluminescent DNA probe assays

and exoantigen test for rapid identification of *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis*. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 867-870.

20. Pounder, J.I., D. Hansen., G.L. Woods, 2006. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides* species by Repetitive-Sequence-Based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2977-2982.
21. Reid, T.M., M.P. Schafer, 1999. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. *Molecular and Cellular Probes* 13: 269-273.
22. Sandhu, G.S., B.C. Kline, L. Stockman, G.D. Roberts, 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2913-2919.
23. Sandin, R.L., C.M. Isada, G.S. Hall, J.W. Tomfor, I. Rutherford, A.L. Rogers, J.A. Washington, 1993. Aberrant *Histoplasma capsulatum*. Confirmation of identity by a chemiluminescence-labeled DNA probe. *Diagnosis of Microbiology Infectious Disease* 17: 235-238.
24. Stockman, L., K.A. Clark, J.M. Hunt, G. Roberts, 1993. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 845-850.
25. Tang, Y.W., H. Li, M.M. Durkin, E.S. Sefers, S. Meng, P.A. Connolly, C.W. Stratton, L.J. Wheat, 2006. Urine polymerase chain reaction is not as sensitive as urine antigen for the diagnosis of disseminated histoplasmosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54: 283-287.
26. Taylor, M.L., M.R. Reyes-Montes, C.B. Chávez-Tapia, E. Curiel-Quesada, E. Duarte-Escalante, G. Rodríguez-Arellanes, G.R. Peña-Sandoval, F. Valenzuela-Tovar, 2000. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. *In: Benedik, M. (ed.)*, *Research Advances in Microbiology*. Global Research Network, Kerala. Pp. 29-35.
27. Taylor, M.L., G. Rodríguez-Arellanes, M.R. Reyes-Montes, R. Romero-Martínez, 2006. *Histoplasma capsulatum* y la epidemiología de la histoplasmosis. *In: Méndez-Tovar, L.J., R. López-Martínez, F. Hernández-Hernández (eds.)*, *Actualidades en Micología Médica*, Contenido Temático del VI Diplomado en Micología Médica Dr. Ernesto Macotela Ruiz. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. Pg. 201-209.
28. Taylor, M.L., G.M. Ruiz-Palacios, M.R. Reyes-Montes, G. Rodríguez-Arellanes, L.E. Carreto-Binaghi, E. Duarte-Escalante, A. Hernández-Ramírez, A. Pérez, R.O. Suárez-Álvarez, Y.A. Roldán-Aragón., M. Romero-Martínez, J.H. Sahaza-Cardona, J. Sifuentes-Osornio, L.E. Soto-Ramírez, 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 Immunology and Medical Microbiology* 45: 435-441.
29. Ueda, Y., A. Sano, M. Tamura, T. Inomata, K. Kamei, K. Yokoyama, F. Kishi., J. Ito, Y. Mikami, M. Miyaji, K. Nishimura, 2003. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. *Veterinary Microbiology* 94: 219-224.
30. Van Burik, J.A., D. Myerson, R.W. Schreckhise, R.A. Bowden, 1998. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1169-1175.
31. Wheat, L.J., 2003. Current diagnosis of histoplasmosis. *Trends in Microbiology* 11: 488-494.
32. Wheat, L.J., H. Wheat, P. Connolly, M. Kleiman, K.S. Supparatpinyo, K. Nelson, A. Restrepo, 1997. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clinical Infectious Disease* 24: 1169-1171.

