



# Estado actual de la tipificación del hongo patógeno *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: una revisión de los hallazgos

María del Rocío Reyes-Montes<sup>1</sup>, María Lucía Taylor<sup>1</sup>,  
Everardo Curiel-Quesada<sup>2</sup> y Ana Cecilia Mesa Arango<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología de Hongos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México D.F., México; <sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

## Resumen

En la actualidad, la clasificación de cepas de microorganismos se realiza con base en diferentes métodos de tipificación, los cuales deben reunir ciertos criterios para ser ampliamente utilizados. En la epidemiología de diversas enfermedades con etiología fúngica se están usando los métodos fenotípicos y genotípicos. Sin embargo, las deficiencias asociadas a los análisis fenotípicos han conducido al desarrollo de tipificaciones genotípicas, que comprenden diferentes métodos de estudio de la diversidad polimórfica del ADN incluyendo la secuenciación de genes, con el objeto de diferenciar y relacionar aislamientos o cepas. De esta manera se pueden identificar distintos brotes de infección y la transmisión de patógenos nosocomiales, además de determinar la fuente de infección, así como reconocer aislamientos virulentos. Este trabajo analiza los métodos empleados en la tipificación de *Histoplasma capsulatum*, agente causal de la micosis sistémica conocida como histoplasmosis, con el fin de recomendar aquéllos que aportan resultados reproducibles y confiables.

## Palabras clave

*Histoplasma capsulatum*, Histoplasmosis, Tipificación molecular

## Current knowledge on the strain typing of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: A review of the findings

## Summary

The classification of microbial strains is currently based on different typing methods, which must meet certain criteria in order to be widely used. Phenotypic and genotypic methods are being employed in the epidemiology of several fungal diseases. However, some problems associated to the phenotypic methods have fostered genotyping procedures, from DNA polymorphic diversity to gene sequencing studies, all aiming to differentiate and to relate fungal isolates or strains. Through these studies, it is possible to identify outbreaks, to detect nosocomial infection transmission, and to determine the source of infection, as well as to recognize virulent isolates. This paper is aimed at analyzing the methods recently used to type *Histoplasma capsulatum*, causative agent of the systemic mycosis known as histoplasmosis, in order to recommend those that yield reproducible and accurate results.

## Key words

*Histoplasma capsulatum*, Histoplasmosis, Molecular typing

### Dirección para correspondencia:

Dr. María del Rocío Reyes-Montes  
Laboratorio de Inmunología de Hongos  
Departamento de Microbiología y Parasitología,  
Facultad de Medicina, UNAM  
04510, México D.F., México  
Tel.: +525 623 2462; Fax: +525 623 2459  
E-mail: remoa@servidor.unam.mx

Acceptado para publicación el 18 de Octubre de 2000

A pesar del incremento de las infecciones fúngicas en los últimos años, el panorama epidemiológico de las principales micosis sistémicas en el mundo ha sufrido pocos cambios y aún persisten grandes vacíos en su información, especialmente, en lo referente a la delimitación de zonas de alta y baja prevalencia para ciertas micosis y en las contradicciones asociadas al foco infeccioso que permitirían definir el origen preciso de la fuente de infección. En las investigaciones sobre epidemiología y patogénesis, se han utilizado una amplia variedad de técnicas inmunológicas, bioquímicas y genéticas, las cuales han ayudado a identificar aislamientos de hongos obtenidos de casos clínicos y del ambiente. La tipificación de estos aislamientos conduce a la caracterización fidedigna de ellos, y sirve para apoyar datos epidemiológicos fehacientes. La utilización de una característica particular, para tipificar aislamientos o cepas, está relacionada con la estabilidad y la diversidad de ésta dentro de la misma especie. Por lo que hay que discriminar aislamientos de cepas, al entender como aislamientos a los especímenes en proceso de caracterización y obtenidos de una clona independiente y como cepas a los especímenes bien caracterizados por lo que pueden servir como referencia y que derivan de una colección de especímenes altamente relacionados de la misma especie [1]. De ahí que la epidemiología moderna trate de emplear diferentes métodos de tipificación para el estudio de diversidad, marcaje, y distribución geográfica de aislamientos o cepas en la naturaleza.

La aplicación de métodos fenotípicos y genotípicos, ha permitido comprender mejor la distribución y frecuencia de las infecciones causadas por hongos. A consecuencia, se podrán auspiciar medidas efectivas para la prevención y control de su transmisión [2].

Entre las micosis donde se han empleado métodos fenotípicos y genotípicos está la histoplasmosis, enfermedad sistémica cuyo agente causal es el patógeno fúngico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Darling 1906), el cual es un hongo geófilo que crece en fase filamentos multicelular en la naturaleza, pero cuando infecta un hospedero susceptible se convierte en levadura unicelular [3]. Bajo condiciones de laboratorio, la transición de la fase multicelular a la unicelular puede ser inducida por cambios de temperatura de 25°C (micelio) a 37°C (levadura). Esta transición dimórfica es de particular interés en *H. capsulatum*, ya que es necesaria para la manifestación de su virulencia [4]. La habilidad de crecer con distintas morfologías implica que el organismo al adaptarse a diferentes condiciones de vida, expresa genes específicos de fase, cuyos productos son críticos para la supervivencia y colonización en un ambiente dado, como forma saprobia e infectante (fase micelial) en ambientes especiales donde se acumulan guano de aves y murciélagos, o bien como forma parasitaria y virulenta (fase levaduriforme) de preferencia en microambientes intracelulares de hospederos mamíferos, incluyendo el ser humano.

Con frecuencia, *H. capsulatum* causa infecciones respiratorias que son generalmente resueltas por el sistema inmune y cuando no se elimina totalmente el hongo, éste puede mantenerse en el hospedero posiblemente en células permisivas, bajo la forma de una infección "latente". Una disminución en la función del sistema inmune debido a circunstancias como edad avanzada, inmunosupresiones o inmunodeficiencias como el sida, puede resultar en una reactivación endógena de la infección, con posible enfermedad sistémica [5]. Hasta hace algún tiempo el estudio epidemiológico de la enfermedad se restringía a informes de casos clínicos, a datos de inmunocontacto sensibilizan-

te con el agente etiológico determinados por la prueba cutánea con el antígeno específico histoplasmina, o bien, por escasos aislamientos del hongo en la naturaleza. Aunque histoplasmosis capsulati, nombre actual de la enfermedad asociada a *H. capsulatum* var. *capsulatum*, está más relacionada a zonas endémicas de América, particularmente de los Estados Unidos de América (EUA) y México, la enfermedad ha sido referida en todo el mundo. Se han descrito aislamientos del hongo tanto en Europa como Asia y África, a partir de suelo y de animales infectados. En México, los datos epidemiológicos iniciales sobre la histoplasmosis aportados por el Dr. González-Ochoa [6-10], y aún los actuales, se han apoyado en la respuesta a la intradermorreacción con la histoplasmina. En los últimos diez años, se creó un grupo multidisciplinario para el estudio de la histoplasmosis en diferentes entidades federativas del país y los resultados, a la fecha, han reforzado los datos inmunoepidemiológicos de esta micosis [11-17] y también han aportado información pionera sobre la epidemiología molecular de la histoplasmosis en el país, además de contribuir al incremento de aislamientos del hongo obtenidos de diversas fuentes como: murciélagos infectados, excretas de aves o de murciélagos; y casos clínicos procedentes de brotes epidémicos o de pacientes con histoplasmosis asociada a sida.

Con el advenimiento de las técnicas moleculares y el subsecuente empleo de éstas en la epidemiología de la histoplasmosis, se lograron mayores aportaciones y un importante incremento en la información sobre esta enfermedad, tanto en la ubicación de nuevas zonas endémicas como en la relación paciente-fuente de infección.

## APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN

Aunque los métodos fenotípicos, como la sensibilidad a antifúngicos y la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), han sido útiles para clasificar algunos hongos como *Candida* y *Cryptococcus*, en el modelo *Histoplasma* fueron menos utilizados. Gaur *et al.* [18] son considerados como un grupo pionero en la fenotipificación de *H. capsulatum*, al introducir el estudio de isoenzimas con el propósito de analizar su variación en 369 aislamientos obtenidos de suelo colectado en cuatro sitios de EUA, dos localizados en Missouri y los restantes en Kentucky y Michigan. Con base en la frecuencia de alelos de los aislamientos obtenidos en las cuatro áreas, los autores encontraron una gran variación en los patrones enzimáticos de ocho enzimas. Asimismo, una importante diversidad fenotípica para seis sistemas enzimáticos fue revelada por el método de isoenzimas en aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de EUA obtenidos a partir de excretas de aves [19]. A pesar de su gran valor en la tipificación de microorganismos, el método de isoenzimas es relativamente largo y laborioso, lo que limita su uso.

Actualmente, los métodos moleculares han permitido establecer marcadores que facilitan la separación y caracterización genética de los diferentes individuos con base en el polimorfismo del ADN. Estos marcadores han sido utilizados para determinar la variabilidad genética de muchos hongos, para clasificar aislamientos de la misma especie, y además para estudiar el origen y evolución de ésta. Por otro lado, su aplicación en análisis epidemiológicos o de poblaciones ha facilitado la elaboración de mapas genéticos y la mejor identificación de aislamientos o cepas.

## TIPIFICACIÓN MOLECULAR

### Sondas para *H. capsulatum*

La primera generación de sondas moleculares con aplicación a estudios epidemiológicos, obtenidas de secuencias específicas de ADN clonado, fueron las de Spitzer *et al.* [20], quienes aislaron de la fase levaduriforme de una cepa virulenta (G217B) los ADN mitocondrial (mtADN) y ribosomal (rADN). Posteriormente, Keath *et al.* [21] clonaron y caracterizaron genes específicos de la fase levaduriforme de la cepa G217B. El producto de la clonación, el gen *yps-3*, resultó ser importante para identificar cepas patógenas, ya que la expresión variable de este gen fue observada en algunas cepas de *H. capsulatum* [22], que diferían en termotolerancia y virulencia [22,23]. Weaver *et al.* [24] aislaron un cADN de 519 bp del gen *yps-3* y lo fusionaron al gen *trpE* de *Escherichia coli*, para generar un péptido híbrido con el que produjeron un anticuerpo monoclonal (Mab 7.1) contra el producto de *yps-3*. Los autores realizaron la inmunoelectrotransferencia (IET) de las fracciones antigénicas de la pared celular de la cepa G217B y del sobrenadante de su cultivo (antígeno crudo), obteniendo con el Mab 7.1 reactividad sólo en una banda de 17.4 kDa del antígeno de pared, lo que les permitió inferir que la localización del producto del gen *yps-3* era en la pared de la célula fúngica.

A la fecha se han elaborado algunas sondas de aplicación comercial, que sirven para la identificación molecular del hongo [25-29].

### Electroforesis en gel de campo pulsado

Steele *et al.* [30] analizaron el ADN cromosomal de cuatro cepas de *H. capsulatum* por electroforesis en gel de campo eléctrico homogéneo (CHEF) y de campo invertido (FIGE). Los patrones de bandas obtenidas fueron confirmados mediante sondas específicas de ADN cromosomal. De las cepas estudiadas, la denominada Downs, obtenida de una úlcera vaginal de una paciente con histoplasmosis diseminada [31], y que tiene la característica de ser avirulenta para el ratón, fue la que presentó mayor número de cromosomas (siete) [30]. Steele *et al.* [30] encontraron además, variabilidad en la movilidad de las bandas de otras cepas estudiadas, que a diferencia de la Downs, presentaban tres o cuatro cromosomas. Aunque este trabajo se orientó a la identificación de cariotipos del hongo, los métodos empleados podrían ser considerados como útiles para la tipificación molecular de cepas tipo Downs.

### Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y análisis de ADN cromosomal por Southern blot

Vicent *et al.* [32], aplicaron el método de RFLP para estudios epidemiológicos de *H. capsulatum*. Al analizar 21 aislamientos de humanos y dos de animales, los agruparon en tres clases, con base en los polimorfismos de su mtADN y rADN. La clase 1 consistió solamente de la cepa Downs; la clase 2 se formó con 14 aislamientos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* de Norteamérica y dos de *H. capsulatum* var. *duboisii* de África; la clase 3 consistió de cuatro aislamientos de Centro y Sudamérica.

Spitzer *et al.* [20], ampliaron los estudios de tipificación de cepas del hongo al incluir nueve aislamientos de suelo de Norteamérica, con el objeto de determinar diferencias en los patrones obtenidos por mtADN entre los aislamientos de suelo y los de origen clínico. Por RFLP de

sus mtADN y rADN, los aislamientos clínicos y de suelo fueron divididos en cuatro clases [20]. Las clases 1 y 3 correspondieron a la clasificación de Vincent *et al.* [32], mientras que los aislamientos de suelo, procedentes de siete sitios geográficos diferentes de EUA, fueron indistinguibles de la mayoría de los aislamientos de humanos y se incluyeron en la clase 2 [20]. Un aislamiento único, de suelo de Florida, representó la clase 4. Asimismo, Spitzer *et al.* [20], observaron que los patrones obtenidos para el ADN total de *H. capsulatum* eran similares a los del mtADN.

Posteriormente, Spitzer *et al.* [33] al estudiar aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de pacientes con histoplasmosis asociada a sida y de pacientes con histoplasmosis diseminada o pulmonar crónica no asociada a sida, que referían residencia en el área de St. Louis, Missouri, encontraron a través del RFLP de los mtADN y rADN y además por Southern blot con la sonda del gen *yps-3*, que los aislamientos de pacientes con sida presentaron un patrón polimórfico del mtADN igual al de la cepa Downs (clase 1), y que además al estudiar el proceso de termotolerancia en los aislamientos, éstos fueron incapaces de crecer a 40°C, característica que es compartida con la cepa Downs. Por otro lado, los aislamientos de histoplasmosis diseminada o pulmonar crónica no asociada a sida, fueron agrupados en la clase 2, donde se ubican la mayoría de los aislamientos clínicos de diferentes regiones de EUA.

En 1992 Keath *et al.* [34], trataron de ampliar el conocimiento acerca de la epidemiología molecular de la histoplasmosis en individuos inmunocomprometidos. Aislamientos de un brote epidémico de histoplasmosis en pacientes con sida y procedentes de una región definida de los EUA, donde la histoplasmosis no es endémica, fueron estudiados con el objeto de determinar si la histoplasmosis de estos pacientes resultaba de la reactivación de una infección previamente adquirida. Los autores utilizaron para clasificar los aislamientos los patrones de RFLP del ADN genómico y del Southern blot generados por dos sondas para *H. capsulatum*, una del mtADN y otra de un fragmento de 1.85 kb obtenido por digestión del gen *yps-3* con la enzima *HindIII*. Tanto los aislamientos obtenidos de pacientes con sida como los procedentes de otras fuentes, fueron agrupados en diferentes clases. Cinco aislamientos de pacientes con sida residentes en Nueva York (zona no endémica) y procedentes de Puerto Rico fueron agrupados en la clase 5, con base en el polimorfismo revelado por la sonda *yps-3*. Estos aislamientos originaron dos patrones diferentes de mtADN designados como subclases 5b y 5c. Además, el aislamiento de un paciente residente en Missouri y procedente de Centroamérica fue subclasificado como 5d, mientras que dos aislamientos de Panamá fueron también incluidos en la clase 5, pero mostraron un perfil distinto de mtADN, por lo que constituyeron la subclase 5a [34]. Este estudio permitió ampliar las clasificaciones anteriores [20,32], al agrupar los diferentes aislamientos de *H. capsulatum* en seis clases y cuatro subclases, que se correlacionan con la distribución geográfica del hongo, y además sugirió la existencia de reactivaciones endógenas en casos de histoplasmosis asociada a sida diagnosticados en áreas no endémicas [34].

Salas *et al.* [35], utilizando el polimorfismo del ADN por RFLP, estudiaron 31 aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a sida. Al analizar los fragmentos de restricción obtenidos con la endonucleasa *HaeIII* y comparándolos con los polimorfismos de las cepas de referencia G217B y Downs (EUA) y la G186B (Panamá), encontraron diez perfiles polimórficos denominados: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J.

Los perfiles A y C fueron los más frecuentes con porcentajes de 33.3 y 29.1, respectivamente. En los demás, se observaron frecuencias menores al 7%. El perfil de la cepa de referencia Downs (clase 1 de la tipificación de EUA) fue semejante al J que incluye dos aislamientos de *H. capsulatum* de pacientes mexicanos con sida. Los perfiles polimórficos de las cepas de referencia G217B y G186B, no se presentaron en los aislamientos estudiados, a pesar de que el perfil de la cepa G217B es el más común en los EUA.

### Polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD)

Debido a que el método RFLP presenta limitaciones como, la baja sensibilidad que dificulta distinguir aislamientos individuales y la necesidad de preparar ADN con alto grado de pureza, para que pueda ser eficientemente cortado por endonucleasas de restricción, Kersulyte *et al.* [36] y Woods *et al.* [37] aplicaron para *H. capsulatum* el método de polimorfismo del ADN amplificado al azar por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Éste resultó ser más sensible y de fácil manejo, ya que utiliza cantidades menores de ADN no necesariamente puro. Los autores pudieron seleccionar oligonucleótidos que fueron útiles para agrupar cepas y aislamientos semejantes de *H. capsulatum* y obtener resultados reproducibles. A partir de 29 aislamientos clínicos del hongo agrupados en la clase 2, encontraron por RAPD-PCR mayor diversidad que la demostrada por RFLP.

Más recientemente, Poonwan *et al.* [38] analizaron por RAPD-PCR 12 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* de pacientes de Tailandia y uno de EUA. Al utilizar tres oligonucleótidos por separado, los aislamientos se clasificaron de 2 a 4 grupos, siendo los procedentes de Tailandia muy similares entre sí, y claramente diferentes del aislamiento de Norteamérica. Además, los autores identificaron una banda común de 700 bp, la cual se secuenció para diseñar oligonucleótidos para PCR que resultaron ser 100% efectivos en la identificación de aislamientos de origen tailandés.

Como parte de los avances recientes en la epidemiología de la histoplasmosis en México, se empleó RAPD-PCR para el análisis molecular de los patrones polimórficos del ADN del hongo aislado de murciélagos infectados. Al utilizar este método con un sólo oligonucleótido, se encontraron dos patrones polimórficos de ADN en los aislamientos procedentes de murciélagos infectados y capturados al azar en los estados de Guerrero y Morelos [39]. Para definir con mayor precisión estos grupos, Taylor *et al.* [40] estudiaron estos aislamientos de *H. capsulatum*, junto con otros obtenidos de murciélagos migratorios capturados en los estados de Puebla y Oaxaca, mediante una modificación del RAPD-PCR usando doble oligonucleótido para amplificar el ADN genómico, la cual, tiene la característica de aumentar el polimorfismo genético. Se observó un patrón polimórfico común en la mayoría de los aislamientos, por lo que este patrón de ADN podría funcionar como marcador fúngico para la infección de murciélagos y para definir las áreas geográficas de dispersión del hongo. Por otro lado, Reyes-Montes *et al.* [41] caracterizaron aislamientos clínicos de *H. capsulatum* obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a sida, que referían una residencia definida. Los resultados de genotipificación por RAPD-PCR mostraron que la mayoría de los aislamientos clínicos se relacionaron en un 94%. Estos mismos autores [42], analizaron nuevos aislamientos de *H. capsulatum*

obtenidos de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a sida, comparándolos con cepas de casos clínicos de Guatemala, Colombia, Panamá y EUA, así como con aislamientos de diferentes fuentes en la naturaleza procedentes de México. Los polimorfismos del ADN obtenidos por RAPD-PCR con un oligonucleótido, permitieron ubicar la mayoría de los aislamientos clínicos procedentes de México en un sólo grupo. Este método demostró que los aislamientos estudiados de pacientes mexicanos con histoplasmosis asociada a sida forman un grupo muy relacionado que es independiente de su origen geográfico. Asimismo, el RAPD-PCR detectó diferencias entre algunos aislamientos que no fueron reveladas por métodos fenotípicos como, el perfil de electrotipos determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y la presencia de bandas antigénicas específicas reconocidas por suero inmune en IET [41,42]. La figura 1 muestra ejemplos de los patrones de ADN polimórfico generados por RAPD-PCR, de aislamientos clínicos de *H. capsulatum* asociados o no a sida.

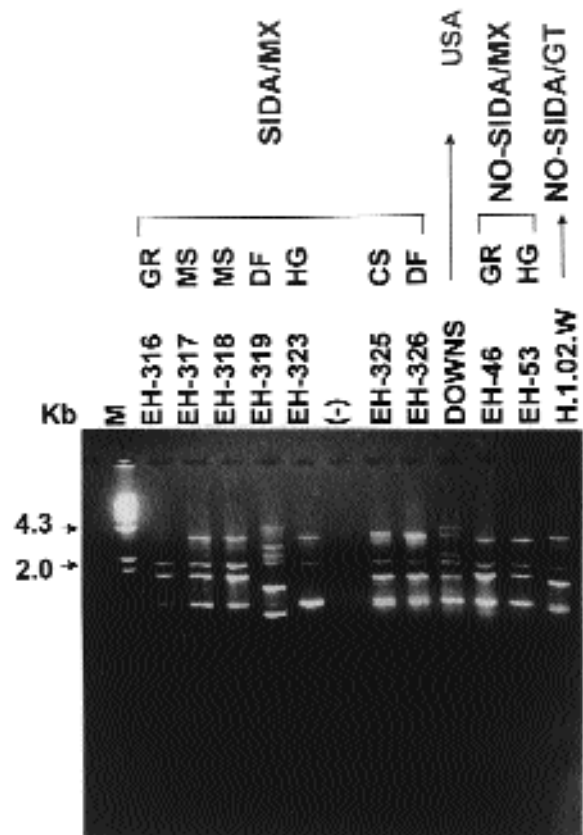


Figura 1. Patrones de RAPD-PCR de 11 aislamientos clínicos de *H. capsulatum*. De los aislamientos utilizados siete procedieron de pacientes con histoplasmosis asociada a sida (EH-316-319, EH-323, EH-325, EH-326) y cuatro de casos clínicos no asociados a sida (DOWNS, EH-46, EH-53, H.1.02.W). El aislamiento del ADN y el procedimiento del RAPD-PCR se llevó a cabo de acuerdo con lo referido por Reyes-Montes *et al.* [42]. Los productos amplificados con el oligonucleótido 5'-AACGCGCAAC-3' se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, el cual después de coloreado con bromuro de etidio fue fotografiado con una película Polaroid 667. Abreviaturas: M- ADN del fago  $\lambda$  cortado con *HindIII*; GR- Guerrero; MS- Morelos; DF- Distrito Federal; HG- Hidalgo; CS- Chiapas; EUA- Estados Unidos de América; GT- Guatemala.

## Secuenciación de ADN

Carter *et al.* [43] analizaron 30 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* procedentes de Indianápolis, Indiana, EUA. En este estudio se planteó determinar si los intercambios genéticos eran importantes en el ciclo de vida del hongo, además de ver si existían subpoblaciones del hongo que se correlacionaban con la severidad de la enfermedad o con el estado inmune del hospedero. Los autores desarrollaron marcadores bialélicos a partir de secuencias de ADN polimórfico amplificadas con oligonucleótidos específicos, mediante una variación del RAPD conocida como AP-PCR. Las bandas de amplificación comunes a diferentes aislamientos se sometieron a análisis del polimorfismo en la conformación de cadena sencilla (SSCP). La secuenciación de las bandas que mostraron polimorfismo simplificó el estudio de aislamientos adicionales mediante RFLP. Con esta metodología se encontró que cada aislamiento tenía un genotipo multilocus único, por lo que infirieron que había recombinaciones frecuentes dentro de la población de *H. capsulatum* estudiada. Sin embargo, los autores no encontraron asociación entre los aislamientos de pacientes inmunocomprometidos y los procedentes de otras manifestaciones clínicas.

Posteriormente, Carter *et al.* [44] utilizaron 11 marcadores bialélicos, obtenidos mediante el análisis de fragmentos alélicos generados por la amplificación de secuencias polimórficas del ADN con oligonucleótidos específicos, para analizar poblaciones de *H. capsulatum* procedentes de EUA y de otros países, y observaron que en el caso de cepas aisladas de EUA estos marcadores mostraban polimorfismos al digerir sus fragmentos con enzimas de restricción. Aunque estos marcadores son considerados como una buena herramienta para analizar cepas y medir la extensión del flujo de genes del hongo dentro de diferentes regiones de los EUA, tienen la desventaja de ser monomórficos para regiones más distantes, por lo que no pueden ser utilizados para investigar la diversidad de cepas procedentes de otros países. Simultáneamente, los autores encontraron tres marcadores multialélicos que tienen la característica de ser hipervariables y por lo tanto altamente polimórficos, debido a la variación en las longitudes y secuencias de sus productos de amplificación, y que tienen la característica de presentar secuencias muy repetitivas y conservadas (microsatélites), por lo que estos tres marcadores multialélicos resultan adecuados para tipificar y determinar niveles de variación genética de aislamientos del hongo, provenientes de regiones de EUA y de otros países [44]. A la fecha se ha encontrado cinco loci microsatélites en el genoma de *H. capsulatum*, los cuales son capaces de discriminar aislamientos con características muy peculiares [45].

Finalmente, Jiang *et al.* [46] tipificaron 24 aislamientos de *H. capsulatum* a través de variaciones en la secuencia nucleotídica de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS1, ITS2) y del gen 5.8S rARN. Cuando alinearon las secuencias de los aislamientos estudiados, encontraron 10 diferentes patrones de secuencias designados como tipos A (con 3 representaciones A-1, A-2 y A-3), B hasta el H. Doce aislamientos de Indianápolis se clasificaron en cuatro tipos diferentes (A-1, A-2, A-3, F), dos de Nueva York en el tipo G, tres de distintas ciudades de EUA en el tipo F, y los restantes se ubicaron en tipos diferentes. En este estudio la cepa Downs (clase 1) se agrupó con dos aislamientos tipo F, uno de Indianápolis y otro de Houston (clase 2), por lo que los autores sugieren que este método de tipificación reubica aislamientos de otras clasificaciones.

**Tabla 1.** Eficiencia de los métodos de tipificación para *H. capsulatum*.

Sistemas de tipificación	Reproducibilidad	Discriminación de clases y subclases de aislamientos o cepas
<i>Fenotípicos</i>		
Isoenzimas	Buena	Buena (clases)
Termotolerancia	Buena	Buena (clases)
SDS-PAGE	Buena	Mala
IET	Mala*	Buena (clases)
<i>Genotípicos</i>		
Southern blot	Buena	Excelente (subclases)
CHEF, FIGE	Buena	Buena (clases)
RFLP	Buena	Excelente (clases)
RAPD	Buena**	Excelente (subclases)
Secuenciación	Excelente	Excelente (clases/subclases)

Los sistemas fueron evaluados de acuerdo con el criterio de los autores. SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio); IET (immunoelectrotransferencia); CHEF (electroforesis en campo homogéneo); FIGE (electroforesis en campo invertido); RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción); RAPD (polimorfismo del ADN amplificado al azar).

\*Depende de la calidad del antisuero; \*\*Cuando los reactivos han sido perfectamente estandarizados.

## CONCLUSIÓN

La presente revisión resalta las bondades de las técnicas moleculares para estudios epidemiológicos de la histoplasmosis, mismas que se pueden observar en forma resumida en la tabla 1, valorando la aplicación de metodologías que varían desde las más sencillas hasta las más complejas, como lo refieren Taylor *et al.* [47]. Sin embargo, nuestra experiencia en estudios de epidemiología molecular de esta enfermedad, nos permite recomendar los métodos que generan mayor especificidad y se fundamentan en procesos menos complicados y más accesibles a la comunidad científica, como son el RFLP y el RAPD-PCR.

*El presente trabajo refiere datos de investigación asociadas a proyectos financiados por DGAPA-UNAM (IN-203294 y IN-203197) y CONACYT (1018P-M).*

## Bibliografía

1. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 332-370.
2. Pfaller MA. Epidemiological typing methods for mycoses. *Clin Infect Dis* 1992; 14: S4-S10.
3. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. En: *Medical Mycology*. Philadelphia. Lea & Febiger 1992: 464-513.
4. Medoff G, Kobayashi GS, Painter AA, Trevis S. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1987; 55: 1355-1358.
5. Eissenberg LG, Goldman E. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: New perspectives on histoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 4: 411-421.
6. González-Ochoa A, Cervantes-Ochoa A. Histoplasmosis epidémica y su prevención. *Rev Inst Salubr Enferm Trop (Méx)* 1960; 20: 129-145.
7. González-Ochoa A. Epidemiología de la histoplasmosis primaria en México. *Rev Inst Salubr Enferm Trop (Méx)* 1963; 23: 65-80.
8. González-Ochoa A. Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. *Rev Inst Salubr Enferm Trop (Méx)* 1963; 23: 81-86.
9. González-Ochoa A. Las micosis pulmonares en México y Centro América. *Rev Inst Salubr Enferm Trop (Méx)* 1969; 29: 179-196.
10. González-Ochoa A. Geografía de las micosis profundas. *Rev Inst Salubr Enferm Trop (Méx)* 1975; 35: 85-96.
11. Taylor ML, Pedroza-Serés M, Gámez-Aranda A, Toriello C. Retrospective serological study of histoplasmosis in Mexico. *Mycoses* 1993; 36: 25-30.
12. Taylor ML, Toriello C, Pérez-Mejía A, et al. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological approach. *Rev Mex Mic* 1994; 10: 49-62.
13. Taylor ML, Granados J, Toriello C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. *Mycoses* 1996; 39: 375-379.
14. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Rodríguez-Arellanes G, Duarte-Escalante E, Flores-Estrada JJ. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. *Ciencia y Desarrollo* 1997; 23: 58-63.
15. Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the State of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 1997; 130: 137-141.
16. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Chávez-Tapia CB, et al. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. *Res Adv in Microbiology* 2000; 1: 29-35.
17. Taylor ML, Morales-Quiroz A, Chávez-Cortés CR, García-Torres D, Montañón-Ortiz G, Pedroza-Serés M. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. *Gac Med Méx* 2000; 136: 441-448.
18. Gaur PK, Lichtwardt RW, Hamrick JL. Isozyme variation among soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Exp Mycol* 1981; 5: 69-77.
19. Hamrick JL, Lichtwardt RW, Lan C. Levels of isozyme variation within and among *Histoplasma capsulatum* localities. *Trans Kansas Acad Sci* 1986; 89: 49-56.
20. Spitzer ED, Lasker BA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1989; 57: 1409-1412.
21. Keath EJ, Spitzer ED, Painter AA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2369-2372.
22. Keath EJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence. *Infect Immun* 1989; 57: 1384-1390.
23. Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest* 1986; 78: 1638-1647.
24. Weaver CH, Sheehan KCF, Keath EJ. Localization of a yeast-phase-specific gene product to the cell wall in *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1996; 64: 3048-3054.
25. Keath EJ, Spitzer ED, Painter AA, Travis SJ, Kobayashi GS, Medoff G. DNA probe for the identification of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2369-2372.
26. Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 419-421.
27. 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: 845-850.
28. Hall GS, Pratt-Rippin K, Washington JA. Evaluation of a chemiluminescent probe assay for identification of *Histoplasma capsulatum* isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3003-3004.
29. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 1995; 2913-2919.
30. Steele PE, Carle GF, Kobayashi GS, Medoff G. Electrophoretic analysis of *Histoplasma capsulatum* chromosomal DNA. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 983-987.
31. Gass M, Kobayashi GS. Histoplasmosis. An illustrative case with unusual vaginal and joint involvement. *Arch Dermatol* 1969; 100: 724-727.
32. Vincent RD, Goewert R, Goldman WE, Kobayashi GS, Lambowitz AM, Medoff G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. *J Bacteriol* 1986; 165: 813-818.
33. Spitzer DE, Keath EJ, Travis SJ, Painter AA, Kobayashi GS, Medoff G. Temperature-sensitive variants of *Histoplasma capsulatum* isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis* 1990; 162: 258-261.
34. Keath EJ, Kobayashi GS, Medoff G. Typing of *Histoplasma capsulatum* by restriction fragment length polymorphisms in a nuclear gene. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2104-2107.
35. Salas-Rios MA, Reyes-Montes MR, Martínez-Rivera MA, Curiel-Quesada E, Taylor ML. Genotipificación de cepas de *Histoplasma capsulatum* aisladas de pacientes con histoplasmosis asociada al SIDA, mediante el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998; 11: 202-207.
36. Kersulyte D, Wood JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol* 1992; 174: 7075-7079.
37. Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction based epidemiological and clinical studies. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 463-464.
38. Poonwan N, Imai T, Mekha N, et al. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains isolated from clinical specimens in Thailand by a PCR-based random amplified polymorphic DNA method. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3073-3076.
39. Chávez-Tapia CB, Vargas-Yáñez R, Rodríguez-Arellanes G, et al. 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 Méx* 1998; 11: 187-191.
40. Taylor ML, Chávez-Tapia CB, Reyes-Montes MR. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. *Fungal Genet Biol* 2000; 30: 207-212.
41. Reyes-Montes MR, Bobadilla-del Valle M, Martínez-Rivera MA, et al. Tipificación de aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998; 11: 195-201.
42. Reyes-Montes MR, Bobadilla-Del Valle M, et al. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1404-1408.
43. Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, White TJ. Clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* from Indianapolis, Indiana, have a recombinant population structure. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2577-2584.
44. Carter DA, Burt A, Taylor JW, Koenig GL, Dechairo BM, White TJ. A set of electrophoretic molecular markers for strain typing and population genetic studies of *Histoplasma capsulatum*. *Electrophoresis* 1997; 18: 1047-1053.
45. Carter D, Kasuga T, White T, Bui T, Taylor J. *Histoplasma* and molecular typing. En: *Abstract's Book, 14th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. Buenos Aires. Asociación Argentina de Micología 2000: 67.
46. Jiang B, Bartlett MS, Allen SD, 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: 241-245.
47. Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 126-146.