

Artículo original

Evaluación de una PCR anidada para el diagnóstico de histoplasmosis en muestras de médula ósea

Nataly García^{a,*}, María Mercedes Panizo^a, Víctor Alarcón^a, Giuseppe Ferrara^a, Ana María Capote^a, Xiomara Moreno^b, Maribel Dolande^a

^aDepartamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". ^bInstituto Médico La Floresta. Caracas, Venezuela.

Recibido 20 de enero de 2017; aceptado 21 de marzo de 2017

Resumen: La histoplasmosis es una enfermedad causada por *Histoplasma capsulatum*, que afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos, especialmente con SIDA. El objetivo de este trabajo fue realizar una comparación entre el cultivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada en 35 muestras de médula ósea, provenientes de pacientes con SIDA y diagnóstico clínico presuntivo de histoplasmosis diseminada, para la detección de ADN de *H. capsulatum*. Se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 80%, valor predictivo positivo de 61,5%, valor predictivo negativo de 91,1%, y una concordancia del 80% para la PCR anidada con respecto al cultivo. La PCR anidada evaluada en este estudio es una herramienta valiosa y complementaria para el diagnóstico de la histoplasmosis en pacientes con SIDA, utilizando muestras de médula ósea. Los resultados obtenidos deben ser interpretados tomando en cuenta aspectos epidemiológicos y la sintomatología clínica del paciente, siendo útil para predecir con éxito la ausencia de la enfermedad, sobre todo en regiones con elevada prevalencia.

Palabras clave: histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, SIDA, médula ósea, PCR anidada, cultivo.

Evaluation of a nested PCR for the diagnosis of histoplasmosis in bone marrow specimens

Abstract: Histoplasmosis is a disease produced by *Histoplasma capsulatum* which mainly affects immunosuppressed patients, especially those with AIDS. The aim of this study was to compare culture and nested polymerase chain reaction (nPCR) diagnosis in 35 bone marrow specimens, from patients with AIDS and presumptive clinical diagnosis of disseminated histoplasmosis, for *H. capsulatum* detection. Nested PCR showed values of 80% sensitivity and specificity; 61.5% of positive predictive and 91.1% of negative predictive values, with 80% of agreement with culture. The nPCR evaluated in this study is a valuable and complementary tool for histoplasmosis diagnosis in AIDS patients using bone marrow specimens. These results should be interpreted considering epidemiological aspects and clinical symptoms of the patient, being useful to predict with success the absence of the disease, especially in high prevalence areas.

Keywords: histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, AIDS, bone marrow, nested PCR, culture.

* Correspondencia:
E-mail: natalygarcia08@gmail.com

Introducción

La histoplasmosis es una micosis que se distribuye en todo el mundo, siendo endémica en el continente americano. Es causada por *Histoplasma capsulatum*, que comprende actualmente un complejo de hongos dimorfos que se encuentran en suelos enriquecidos con nitrógeno/fosfato, particularmente guano de aves. Las especies de *Histoplasma* se encuentran en el medio ambiente en forma filamentosa, reproduciéndose asexualmente mediante macroconidias y

microconidias, favorecidas por temperaturas entre 18-20 °C y humedad superior al 60%. Las microconidias pueden ser inhaladas por varias especies de mamíferos incluido el hombre, y se convierten rápidamente en levaduras a temperaturas entre 35-37 °C, persistiendo en los tejidos del hospedero causando la enfermedad [1,2].

H. capsulatum sensu lato es un complejo de al menos ocho clados distribuidos geográficamente de la siguiente manera: Australia, Países Bajos, Eurasia, América del Norte clases 1 y 2 (NAm 1 y NA 2), América Latina grupos A y

B (LAm A y LAm B) y África. Con la excepción del grupo Eurasiático, los clados se consideran especies filogenéticas [2].

La histoplasmosis afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos, especialmente a los que cursan con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en los cuales hay una inadecuada respuesta inmune mediada por linfocitos T. Tradicionalmente, el diagnóstico no es sencillo y se realiza mediante cultivo (considerado el patrón de oro), detección de antígeno y anticuerpos, coloraciones y estudios histopatológicos [1-6].

La severidad de la enfermedad depende básicamente del grado de exposición al hongo y el estado inmune del individuo. En pacientes con SIDA, la histoplasmosis es una infección oportunista y la forma clínica diseminada es la presentación más frecuente y severa, con una elevada tasa de mortalidad si no es diagnosticada y tratada a tiempo; por lo tanto, es importante desarrollar técnicas que permitan realizar un diagnóstico precoz y rápido de la enfermedad [1,3-6].

Entre la variedad de muestras clínicas que se pueden emplear para el estudio de esta entidad clínica se encuentra la médula ósea, considerada una muestra necesaria e importante cuando se requiere el estudio de citopenias, enfermedades infecciosas invasoras y fiebre de origen desconocido, condiciones generalmente presentes en pacientes con SIDA. Algunos autores han sugerido que es una muestra de gran utilidad para el diagnóstico de esta micosis, indicando que su cultivo favorece la mayor recuperación del hongo [4,7].

La biología molecular ha permitido el desarrollo de técnicas para la detección del ADN de hongos en muestras clínicas; entre ellas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y la PCR en tiempo real. Ambas técnicas han sido descritas como alternativas, útiles en el diagnóstico, para confirmar la presencia de *H. capsulatum*, con valores de especificidad de 100% y valores de sensibilidad por encima del 75%. En nuestro país son escasos los estudios donde se han empleado técnicas moleculares para el diagnóstico de la histoplasmosis, contrario a lo que sucede a nivel mundial, donde algunos investigadores han descrito que la PCR anidada se caracteriza por poseer altos niveles de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de esta enfermedad [3-5,9-12].

Por las razones antes expuestas, el objetivo de este trabajo fue realizar una comparación entre el cultivo y la (PCR) anidada en muestras de médula ósea, para la detección de ADN de *H. capsulatum*.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio comparativo y de corte transversal, en el que se analizaron 35 muestras de médula ósea obtenidas con el sistema Vacutainer® y anticoaguladas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), provenientes de pacientes con SIDA y diagnóstico clínico presuntivo de histoplasmosis diseminada. Las muestras fueron colectadas

en centros hospitalarios de la ciudad de Caracas, durante el período comprendido entre enero 2011 a diciembre 2014, y enviadas al Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR) para su procesamiento. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda.

Debido a que *H. capsulatum* es un hongo intracelular, para aumentar la posibilidad de recuperación del hongo, las muestras fueron centrifugadas y se retiró la capa de glóbulos blancos (Buffy coat) para su cultivo, separando una alícuota que fue conservada a -20 °C hasta la realización posterior de la PCR anidada [12-14]. Para el cultivo de hongos se utilizaron agar Sabouraud con cloranfenicol (Oxoid) y Mycosel® (BBL) incubados a 28 °C, y agar infusión cerebro corazón (Oxoid) incubado a 35 °C.

El ADN genómico del microorganismo fue extraído mediante el QIAmp DNA Minikit® (Qiagen, Hilden, Alemania), utilizando el protocolo de extracción de ADN para muestras de tejidos, cultivo y líquidos biológicos. A 200 µL de la muestra se le adicionó 20 µL de proteinasa K (Invitrogen) no provista en el kit y el procedimiento continuó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el estudio molecular se realizó una PCR anidada como la descrita por Bialek *et al* [3] con modificaciones, estandarizándola a las condiciones del laboratorio de Micología Molecular del Departamento de Micología del INHRR.

Para la primera ronda de la PCR anidada se utilizó 5 µL del ADN extraído en una mezcla de reacción que contenía 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen); buffer 10X (Invitrogen); 100 mM de oligonucleótidos (Promega); 0,1 mM de ditiotriol (Invitrogen); 40 U de RNase Out -inhibidor recombinante de nucleasas- (Invitrogen); 10 mM de cada uno de los cebadores externos Hc I y Hc II (Bioneer Corporation); 5 U/µL de Taq ADN polimerasa (Promega) y agua libre de nucleasas (Invitrogen), hasta completar un volumen de 50 µL por reacción. Para la segunda ronda se realizó una dilución 1:100 del producto de la primera ronda, el cual fue diluido con agua libre de nucleasas (Invitrogen). Para la preparación de la mezcla de esta ronda se utilizaron 5 µL de la dilución realizada y los mismos componentes de la primera, con excepción del ditiotriol, el inhibidor recombinante de nucleasas y los cebadores internos: Hc III y Hc IV (Bioneer Corporation). Ambas rondas se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), bajo las mismas condiciones: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por un minuto, y finalmente un ciclo a 72 °C por 7 minutos. Se tomaron como muestras positivas aquellas donde se evidenció una banda de 210 pb en la segunda ronda.

Como controles de la PCR anidada se utilizó ADN de la cepa F-412000-231 de *H. capsulatum* perteneciente a la colección de hongos del INHRR como control positivo de muestras y agua libre de nucleasas como control negativo. Adicionalmente, se utilizó como control interno de prueba la detección de una región blanco del gen humano de

la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (GenBank número de acceso J04038.1), para comprobar la presencia de ADN amplificable, sugerido por Bialek *et al* [3]. Para ello se desarrolló una PCR anidada, que se estandarizó a las condiciones del laboratorio. Para la primera ronda se utilizaron los cebadores gap 1 y gap 2, y para la segunda ronda se utilizaron los cebadores gap 3 y gap 4 (Bioneer Corporation). Las mezclas de reacciones fueron idénticas a las descritas anteriormente, tanto para la primera como para la segunda ronda, y la amplificación se realizó usando el mismo termociclador. Las condiciones de amplificación de la primera ronda fueron: 94 °C durante 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos, finalizando a 72 °C durante 5 minutos. Para la segunda ronda las condiciones fueron las mismas, exceptuando que se realizó en 40 ciclos. Se consideraron muestras con amplificación de este gen aquellas donde se observaron bandas de 325 pb y 248 pb en la segunda ronda. Todos los controles se procesaron bajo las condiciones en que se manejaron las muestras.

Los amplicones, obtenidos de ambas PCR anidadas, se sometieron a corridas electroforéticas de 120 voltios durante 30 minutos en geles de agarosa (Invitrogen) preparados al 2%, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL, GIBCO, BRL). Se utilizaron marcadores de peso molecular de 50 y 100 pb (Promega). Los productos se visualizaron en un sistema de documentación de imágenes (Gel Doc XR®, Bio-Rad).

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos fueron analizados mediante una tabla de contingencia de 2x2 y Chi cuadrado de McNemar con corrección de Yates, utilizando el programa estadístico Statgraphics 5.0, considerando valores de $p \leq 0,05$ como significativos. Se calcularon los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN), razones de verosimilitud positivas y negativas (RVP y RVN), así como el porcentaje de concordancia (C) de la PCR anidada con respecto al cultivo [15].

Resultados y discusión

El diagnóstico de la histoplasmosis se ha basado, históricamente, en los hallazgos obtenidos por microscopia y cultivo, considerado este último como el patrón de oro; también se emplean métodos indirectos como la detección de antígeno y anticuerpos, además de los estudios histopatológicos. El tiempo requerido, para la obtención de resultados con estos métodos, limita la instauración de un tratamiento adecuado en pacientes con SIDA e histoplasmosis, y requiere de personal altamente capacitado para la realización de las pruebas y la interpretación de los resultados. Por otra parte, los valores de sensibilidad y especificidad de estos métodos son variables y dependen, tanto del estado inmune del paciente como de la presentación clínica de la enfermedad. Los avances logrados por la biología molecular en la última década han permitido el

desarrollo de técnicas para la detección del *H. capsulatum* en muestras clínicas, siendo una de ellas la PCR anidada, que se caracteriza por sus elevados niveles de sensibilidad y especificidad [1,3,5,9].

En este trabajo se logró evaluar una PCR anidada para el diagnóstico de *H. capsulatum* en muestras de médula ósea, obteniéndose los siguientes resultados: de las 35 muestras analizadas 8 resultaron positivas por cultivo y PCR anidada, 2 resultaron negativas por cultivo y positivas por PCR anidada, 5 positivas por cultivo y negativas por PCR anidada y 20 resultaron negativas por ambas técnicas. En total, 10 muestras fueron positivas por PCR anidada. Se obtuvieron valores de S: 80%; E: 80%; VPP: 61,5%; VPN: 91%; RVP: 4; RVN: 0,25 y concordancia: 80% para la PCR anidada. Los resultados obtenidos en la segunda ronda de la PCR anidada para la detección de *H. capsulatum* se observan en la figura 1, para 3 de las 35 muestras de médula ósea, ensayadas en este estudio. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la PCR anidada y el cultivo ($p < 0,05$), por lo tanto, se considera que la PCR anidada estandarizada se puede utilizar para el diagnóstico de la histoplasmosis en pacientes con SIDA, utilizando muestras de médula ósea. Además, el VPN indicó que la PCR anidada es capaz de excluir la enfermedad en un 91%, demostrando que es

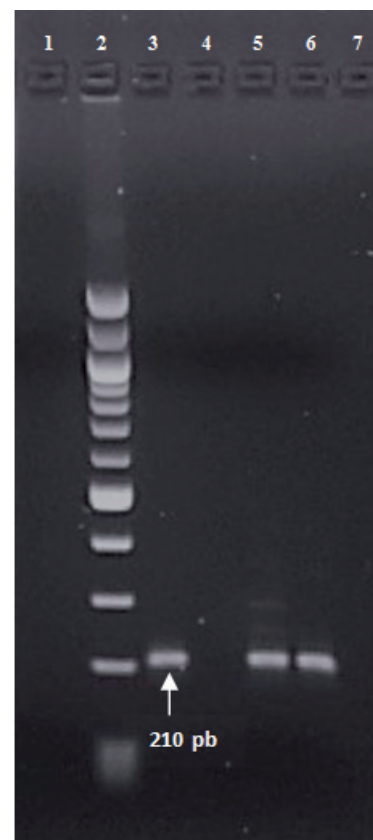


Figura 1. Resultados de la segunda ronda de la PCR anidada para la detección de ADN de *Histoplasma capsulatum* en 3 muestras de médula ósea. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 3: Control positivo de muestras (Cepa F-412000-231 de *H. capsulatum*, INHRR); Carril 4: Muestras de médula ósea negativa N° 7; Carriles 5 y 6: Muestras de médula ósea positivas N° 10 y 15; Carril 7: Vacío.

una prueba de elevado poder diagnóstico, sin embargo se recomienda su uso como técnica complementaria al cultivo de la médula ósea.

Estos resultados son comparables a los reportados en la literatura utilizando como blanco el gen que codifica para la proteína de 100 kDa de *H. capsulatum* [3,4,9], pero es importante destacar que en los estudios revisados se utilizaron varios tipos de muestras, incluyendo en algunos la médula ósea. En el estudio de Bialek *et al* [3], tomado como base para la realización de este trabajo, se utilizaron biopsias de tejido para la estandarización de la PCR anidada, logrando la detección del ADN de la proteína de 100 kDa de este hongo en las muestras utilizadas, con una especificidad para la prueba de 100%. La secuencia del gen que codifica esta proteína es única y específica para *H. capsulatum*, así como esencial para su supervivencia en las células humanas, de allí los resultados de especificidad obtenidos en este trabajo y que avalan su utilización posterior en otros estudios. Por su parte, Maubon *et al* [4], utilizaron 40 muestras de diversa procedencia, de las cuales 15 fueron positivas por cultivo y por PCR anidada, donde solamente 11 fueron muestras de médula ósea. De estas muestras, 10 resultaron positivas y 1 negativa; los valores de sensibilidad y especificidad de este estudio fueron del 100%, respectivamente. Muñoz *et al* [9] utilizaron 146 muestras clínicas de diversa procedencia, de las cuales sólo 7 correspondieron a sangre total, obteniendo 2 muestras positivas por cultivo y 3 por PCR anidada; los valores de sensibilidad y de especificidad para esta prueba, utilizando muestras clínicas, fueron de 100% y 95,2%, respectivamente. Para la evaluación de la PCR anidada en este trabajo sólo se utilizaron muestras de médula ósea, por lo que los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad para esta técnica cobran una gran importancia.

El gen de la proteína de 100 kDa ha demostrado ser un blanco específico para la detección de *H. capsulatum* en diversas muestras clínicas, y Bialek *et al* [3] reconocieron en su trabajo la necesidad de probar e implementar la PCR anidada desarrollada por ellos en regiones con alta endemicidad para la histoplasmosis, reto que fue asumido inicialmente por Maubon *et al* [4] en Guyana Francesa, Muñoz *et al* [9] en Colombia y por Colella y col [8] y los autores de este trabajo en Venezuela. La histoplasmosis es endémica en las Américas, pero no es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo que su prevalencia es difícil de calcular. Desde el inicio de la epidemia del SIDA, los reportes afirman que la histoplasmosis diseminada es la más frecuentemente diagnosticada en estos pacientes, como enfermedad definitoria del síndrome [1,16]. Esta información ha sido confirmada por estudios venezolanos [17-19]. En esta investigación se determinaron las RVP y RVN, obteniendo resultados de 4 y 0,25 respectivamente. Estos valores indican que un resultado positivo por la PCR anidada es aproximadamente 4 veces más probable de obtener en un paciente con histoplasmosis que en un individuo sin la enfermedad, datos que avalan el uso de esta técnica para la detección y descarte de la enfermedad en poblaciones con elevada prevalencia. Particularmente, en

pacientes con SIDA, es importante detectar la presencia de *H. capsulatum* cuando el cultivo ha resultado negativo debido a la baja carga del hongo en la muestra; sin embargo, no se debe olvidar que el resultado debe relacionarse con los antecedentes epidemiológicos y la sintomatología clínica del paciente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Muñoz *et al*, mencionados anteriormente en este estudio [9].

Con el uso de la PCR anidada, al igual que con otras técnicas moleculares, es importante destacar que es posible la obtención de resultados “falsos negativos”: en el caso de este trabajo, cinco muestras resultaron negativas por PCR anidada y positivas por cultivo, por lo que deben considerarse factores clínicos, epidemiológicos y aquellos inherentes a la técnica al momento de realizar e interpretar los resultados de la prueba.

El aspirado de médula ósea es usado comúnmente en la práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas invasoras en pacientes con SIDA, particularmente las causadas por *Mycobacterium avium intracellulare*, *M. tuberculosis* e *H. capsulatum*. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) afecta todos los linajes celulares hematopoyéticos y esto, sumado a las infecciones oportunistas, causa supresión de la médula ósea e induce citopenias específicas. La afinidad del *H. capsulatum* por el sistema retículoendotelial hace de la médula ósea la muestra ideal para el cultivo, ya que la probabilidad de aislar al hongo es elevada; esto haría pensar que también podría considerarse una muestra idónea a ser utilizada en ensayos moleculares [7,20].

La toma de muestra de la médula ósea es un procedimiento invasor y depende de personal bien entrenado, recipientes de recolección estériles (los cuales en sí mismos representan un riesgo de contaminación), así como del envío y transporte adecuado e inmediato al laboratorio para su procesamiento, aspectos que escapan del control del mismo y que son primordiales [13,14].

Debido a que *H. capsulatum* es un hongo intracelular, la utilización de un método como el de lisis-centrifugación (Isolator, Wampole Laboratories Inc., USA), que produce la lisis de los eritrocitos y leucocitos, es el más recomendable para aumentar la posibilidad de recuperación del hongo. Las muestras de médula ósea utilizadas en este estudio fueron colectadas en tubos Vacutainer® con EDTA, debido a que en los centros hospitalarios no se dispone del método anteriormente nombrado, se centrifugaron y se separó la capa de glóbulos blancos, también conocida como “buffy coat”. Varios estudios han reportado la utilidad del “buffy coat”, obtenido con este sistema comercial, para la extracción de ADN proveniente de muestras sanguíneas. El EDTA es un excelente agente anticoagulante y estabilizador celular que, durante la centrifugación, fomenta la separación adecuada de los componentes celulares según sus diferentes densidades; de esta forma, los linfocitos y monocitos forman una capa (buffy coat) justo por encima de los granulocitos y los glóbulos rojos; recolectarla es muy sencillo y su uso favorece el aislamiento del hongo, la obtención de elevadas

concentraciones de ADN posterior a su extracción y por ende, eleva el rendimiento de una prueba de PCR [12-14].

Si las muestras no son enviadas y transportadas adecuadamente al laboratorio para su procesamiento son susceptibles a que las ADNasas y ARNasas humanas actúan sobre el ADN del hongo, disminuyendo su cantidad en la muestra o degradándolo por completo. Por otra parte, la médula ósea es un tejido que posee gran cantidad de hemoglobina y una alta celularidad, por lo tanto, la detección del ADN del hongo representa un reto, debido al desequilibrio existente entre las cantidades de ADN humano y del hongo; ambos elementos pueden inhibir la prueba de PCR [6,13,14,20]. Estos aspectos pueden mejorarse incluyendo un control interno de prueba, en nuestro caso la detección del gen GADPH (datos no mostrados) [3], y la escogencia de un método de extracción como el utilizado en este estudio (columnas de sílica) [13,14], sin embargo, es posible que estos inhibidores no puedan ser removidos totalmente [6,20]. Adicionalmente, se conoce que una inhibición de la amplificación es común en muestras hematológicas, en las cuales los resultados falsos negativos pueden superar el 20%, principalmente por el contenido de hemoglobina presente. Por lo tanto, factores de inhibición, baja cantidad o degradación del ADN del hongo en la muestra y el método de extracción pueden ser los responsables de la aparición de resultados falsos negativos. Debido a lo expuesto anteriormente, la PCR anidada debe ser usada como una técnica complementaria en el diagnóstico de la histoplasmosis en pacientes con SIDA [6,20].

Para concluir, la PCR anidada estandarizada en este estudio, utilizando como blanco la proteína de 100 kDa de *H. capsulatum*, es una herramienta valiosa y complementaria para el diagnóstico de la histoplasmosis en pacientes con SIDA, empleando muestras de médula ósea. Los resultados obtenidos deben ser interpretados tomando en cuenta aspectos epidemiológicos y la sintomatología clínica del paciente, siendo útil para predecir con éxito la ausencia de la enfermedad, sobre todo en regiones con elevada prevalencia. Consideramos importante implementar esta PCR anidada usando otras muestras clínicas importantes como las respiratorias, líquidos biológicos y tejidos, ya que podrían aumentar los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba para el diagnóstico de la histoplasmosis.

Agradecimientos

Al personal auxiliar y administrativo del Departamento de Micología (Mary Rosales, Ismelda Sierra, Gennesys Roque y Johan Isturiz), al personal del Departamento de Virología (Meybe Saavedra, Elsy Gudiño, Pierina D'Angelo y Lieska Rodríguez) y al personal de Microbiología de Alimentos (Anabel Bandes) del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Conflicto de intereses

Los autores no presentan conflictos de intereses.

Referencias

1. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, Sarosi GA. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. *Curr Trop Med Rep*. 2015; 2:70-80.
2. Teixeira MM, Patané JSL, Taylor ML, Gómez BL, Theodoro RC, de Hoog S, Engelthaler DM, *et al*. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6):e0004732. doi:10.1371/journal.pntd.0004732.
3. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson V, Knobloch J, *et al*. Evaluation of two nested PCR analysis for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:1644-7.
4. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2007; 58:441-4.
5. Muñoz C, Cano L, González A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio*. 2010; 14 (Suppl 2):S145-S158.
6. Lion Thomas, editor. *Methods in molecular biology* 1508. Human fungal pathogen identification. *Methods and protocols*. New York: Springer Nature Humana Press; 2017.
7. Calore EE, Tanaka PY, Pérez NM, de Almeida LV. Bone marrow pathology in AIDS. *Pathol Res Pract*. 2004; 200:591-7.
8. Colella M, Mata S, Hartung C, Pérez C, Roselló A, Olaizola C, y col. Identificación de *Histoplasma capsulatum* en muestras clínicas mediante la técnica de PCR en dos rondas. *Kasmera*. 2007; 35:156-63.
9. Muñoz C, Gómez B, Tobón A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, *et al*. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vacc Immunol*. 2010; 17:62-7.
10. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada C, Hall G, Bryne T, *et al*. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:1295-8.
11. Babady E, Buckwalter S, Hall L, Le Febre K, Binnicker M, Wengenack N. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:3204-8.
12. Simona S, Verona V, Boukharib R, Blancheta D, Aznar C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2010; 66:268-73.
13. Chen SCA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with

- emphasis on polymerase chain reactions-based assays. *Med Mycol.* 2002; 40:333-57.
14. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res.* 2003; 543:217-34.
 15. Riegelman RK, Hirsch RP, editores. *Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica.* Publicación científica 531. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; 1992.
 16. Nacher M, Adenis A, Arathoon E, Samayoac B, Lau-Bonilla L, Gómez B, *et al.* Disseminated histoplasmosis in Central and South America, the invisible elephant: the lethal blind spot of international health organizations. The neglected histoplasmosis in Latin America Group. *AIDS.* 2016; 30:167-70.
 17. Reviakina V, Panizo M, Dolande M, Selgrad S. Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas durante cinco años 2002-2006. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2007; 27:112-9.
 18. Mata-Essayag S, Colella MT, Roselló A, de Capriles CH, Landaeta ME, de Salazar CP, *et al.* Histoplasmosis: a study of 158 cases in Venezuela, 2000-2005. *Medicine (Baltimore).* 2008; 87:193-202.
 19. Redondo MC. Disseminated histoplasmosis in Venezuelan AIDS patients. *Infect Dis Clin Pract.* 1995; 4:300-3.
 20. Singh UB, Vijaya Bhanu N, Naga Suresh V, Arora J, Rana T, Seth P. Utility of polymerase chain reaction in diagnosis of tuberculosis from samples of bone marrow aspirate. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75:960-3.