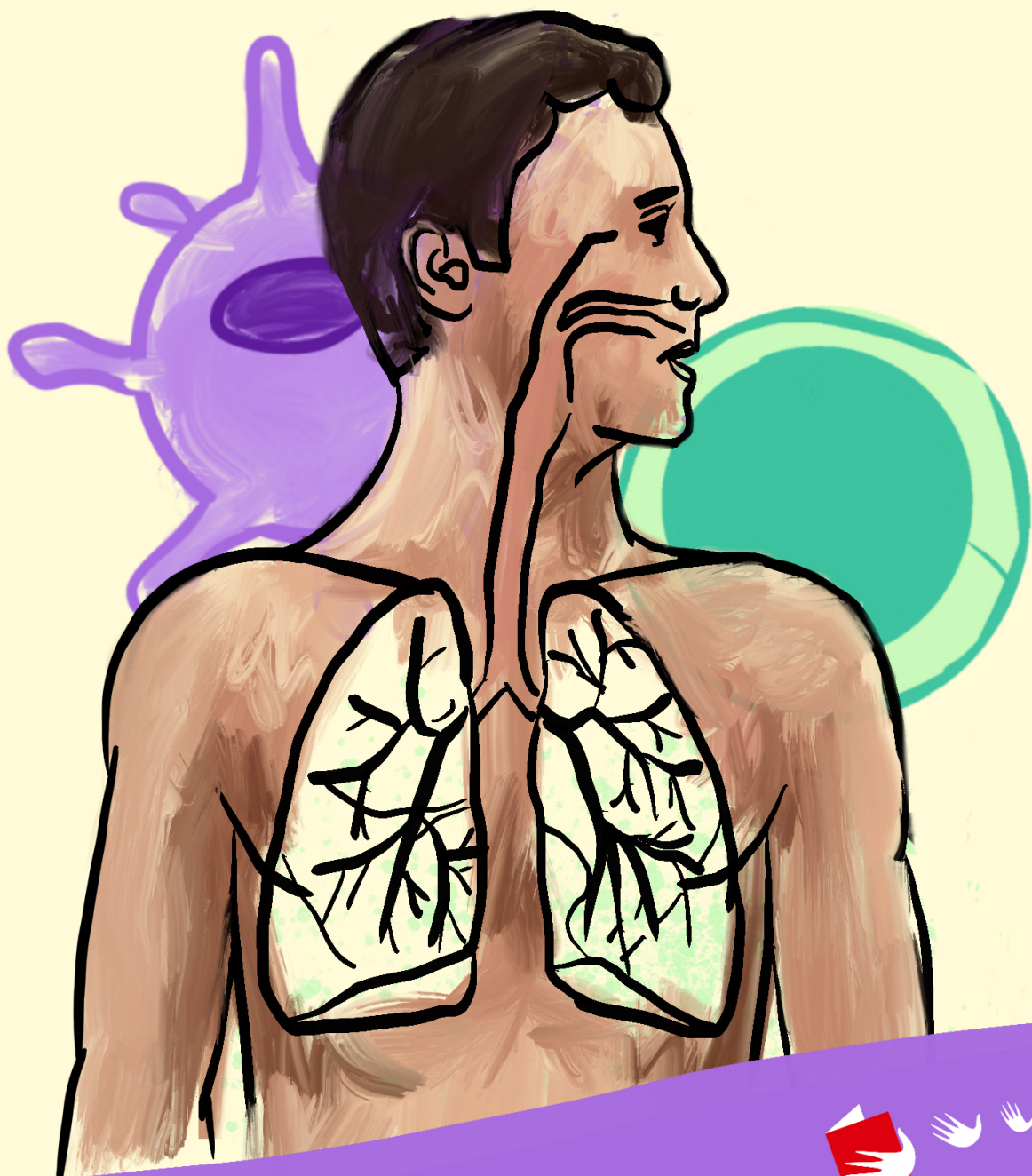


HistoFerón: primer ensayo diagnóstico para la detección de infección latente por un hongo patogénico



Marcela Rubio Carrasquilla
Luz Elena Cano Restrepo
Ernesto Moreno Frías

**HistoFerón: primer ensayo diagnóstico
para la detección de infección latente
por un hongo patogénico**

HistoFerón: primer ensayo diagnóstico para la detección de infección latente por un hongo patogénico

Coordinadores académicos

Marcela Rubio Carrasquilla

Luz Elena Cano Restrepo

Ernesto Moreno Frías



HistoFerón: primer ensayo diagnóstico para la detección de infección latente por un hongo patogénico

1.ª edición: 2023

© Universidad de Medellín

HistoFerón : primer ensayo diagnóstico para la detección de infección latente por un hongo patogénico / coord. acad. Marcela Rubio Carrasquilla, Luz Elena Cano Restrepo, Ernesto Moreno Frías ; coord. ed. Solangy Carrillo-Pineda, Laura Agudelo-Calle. -- 1ª ed. -- Medellín: Universidad de Medellín; Sello Editorial Universidad de Medellín, 2023.

127 p. ; 17x 24 cm.

Incluye referencias bibliográficas

ISBN (electrónico): 978-958-5180-42-0

DOI: 10.22395/9789585180420

1. HONGOS PATÓGENOS. 2. HISTOPLASMOSIS. 3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO. 4. PRUEBAS CLÍNICAS. 4. INTERFERÓN. 5. ANTÍGENOS. 1. Rubio Carrasquilla, Marcela, coord. acad.. 2. Cano Restrepo, Luz Elena, coord. acad.. 3. Moreno Frías, Ernesto, coord. acad.. 4. Carrillo-Pineda, Solangy, coord. ed.. 5. Agudelo-Calle, Laura, coord. ed.. 6. Universidad de Medellín. Sello Editorial Universidad de Medellín.

CDD 616.969

Catalogación bibliográfica - Universidad de Medellín. Biblioteca Eduardo Fernández Botero. Daissy Patricia Zea Mejía.

Sello Editorial Universidad de Medellín

selloeditorial@udemedellin.edu.co

Carrera 87 N.º 30-65

Teléfono: (+57+4) 590 45 00

Medellín, Colombia

Coordinación editorial

Solangy Carrillo-Pineda

Laura Agudelo-Calle

Corrección de estilo

Melissa Perez Pelaez

Diseño de cubierta

Juan Camilo Correa Córdoba

Diagramación

Leonardo Sánchez Perea

Todos los derechos reservados.

Esta publicación no puede ser reproducida, ni en todo ni en parte, por ningún medio inventado o por inventarse, sin el permiso previo y por escrito de la Universidad de Medellín.

Hecho el depósito legal.

Contenido

Lista de abreviaturas	13
Introducción general	19

CAPÍTULO I

Estado del arte

1.1 Histoplasmosis.....	21
1.1.1 Definición – Antecedentes históricos - Etiología - Agente etiológico – Ecología	21
1.1.2 Patogenia. Patología. Interacción hospedero – hongo.....	23
1.1.3 Epidemiología – Brotes	24
1.1.4 Factores y grupos en riesgo para el desarrollo de histoplasmosis.....	27
1.1.5 Principales formas clínicas de la HPM	30
1.1.6 Respuesta Inmune (RI).....	33
1.1.7 Diagnósticos diferenciales.....	39
1.1.8 Diagnóstico por el laboratorio.....	39
1.1.9 Limitaciones para el diagnóstico de formas asintomáticas	44
1.2 Pruebas Tipo IGRA (<i>interferon gamma release assay</i>).....	46
1.2.1 Introducción y antecedentes	46
1.2.2 Fundamento de la prueba IGRA.....	47
1.2.3 Pruebas IGRA en tuberculosis	48
1.2.4. Aplicación de ensayos tipo IGRA en otros modelos.....	53

CAPÍTULO II

Abordaje del problema

2.1 Planteamiento del problema.....	57
2.2 Justificación.....	59
2.3 Hipótesis.....	60

2.4	Objetivos.....	60
2.4.1	Objetivo general	60
2.4.2	Objetivos específicos	60

CAPÍTULO III

Ensayo de liberación de interferón gamma específico para *Histoplasma capsulatum* para detectar individuos infectados asintomáticos: Una prueba de concepto

3.1	Resumen.....	61
3.2	Introducción	62
3.3	Métodos	63
3.3.1	Muestra de la población	63
3.3.2	Pruebas serológicas	66
3.3.3	Antígenos de <i>H. capsulatum</i> para IGRA.....	66
3.3.4	Prueba IGRA	67
3.4	Resultados	69
3.4.1	Características de la población de estudio.....	69
3.4.2	Producción de IFN- γ en respuesta a diferentes antígenos de <i>H. capsulatum</i>	69
3.4.3	Definición del punto de corte de la respuesta de IFN- γ	72
3.4.4	IGRA versus pruebas serológicas.....	73
3.5	Discusión	74
3.5.1	IGRA versus pruebas serológicas.....	75
3.6	Conclusiones	76

CAPÍTULO IV

Hacia una prueba HistoFerón con antígenos molecularmente definidos: una primera aproximación desde la bioinformática

4.1	Introducción	79
4.1.1	Diseños de péptidos en los ensayos IGRA para <i>Mtb</i>	79
4.1.2	Antígenos molecularmente definidos en otros modelos de IGRA.....	81
4.1.3	Diseño de péptidos para un ensayo IGRA: ¿de clase I, o II?	83

4.2	Métodos	84
4.2.1	Identificación de proteínas específicas de <i>H. capsulatum</i>	84
4.2.2	Comparación de secuencias de proteínas	85
4.2.3	Predicción de epítopes T de clase I y II	85
4.3	Resultados y discusión	85
4.3.1	Selección de proteínas inmunogénicas de <i>H. capsulatum</i>	85
4.3.2	Predicción de proteínas de secreción específicas de <i>H. capsulatum</i>	88
4.3.3	Predicción de epítopes T en las proteínas identificadas.....	90
4.4	Conclusiones	92

CAPÍTULO V

Conclusiones y perspectivas futuras

5.1	Discusión general.....	95
5.1.1	Ensayos IGRA (HistoFerón) con Ags filtrados de micelio y levadura ...	97
5.1.2	Ensayos de la prueba HistoFerón con AgM y HSp60, recombinantes (capítulo 3)	102
5.1.3	Diseño de una futura generación de la prueba HistoFerón con antígenos molecularmente definidos (capítulo 4).....	103
5.2	Conclusiones	105
5.3	Perspectivas futuras	106
	Referencias	109

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Reportes de brotes epidémicos de histoplasmosis	25
Tabla 1.2. Factores de riesgo para desarrollar histoplasmosis.....	28
Tabla 1.3. Formas clínicas de histoplasmosis.....	32
Tabla 1.4. Sensibilidad de los métodos diagnósticos de acuerdo con la forma clínica de HPM	39
Cuadro 1. Conceptos que destacar (“ <i>Highlight points</i> ”)	56
Tabla 3.1. Criterios utilizados para la asignación de los grupos.....	64
Tabla 3.2. Poder de discriminación de la prueba IGRA.....	73
Tabla 3.3. IGRA versus pruebas serológicas en el grupo B-Probado.....	74
Tabla 4.1. Similitud en secuencia (porcentaje de identidad de aminoácidos) entre las siete proteínas inmunogénicas de <i>H. capsulatum</i> y sus ortólogos en hongos relacionados y en otros microorganismos no relacionados.....	87
Tabla 4.2. Proteínas resultantes del análisis de ortología y señales de secreción. Seis proteínas (sobre fondo gris) son distintivas de <i>H. capsulatum</i>	90

Lista de figuras

Figura 1.1. Morfología microscópica de <i>H. capsulatum</i>	22
Figura 1.2. Distribución en América y Colombia de la frecuencia de positividad a la histoplasmina.....	43
Figura 1.3. Fundamento de la prueba IGRA	47
Figura 1.4. Métodos de detección del IFN- γ	47
Figura 3.1. Niveles de IFN- γ basal y después de la estimulación con el mitógeno de linfocitos T (PHA), para los cinco grupos de individuos evaluados	70
Figura 3.2. Producción de IFN- γ por cada grupo de individuos después del estímulo con los diferentes extractos de levaduras e histoplasminas	71
Figura 3.3. Producción de IFN- γ por individuos de los diferentes grupos por combinaciones de dos de los cuatro antígenos seleccionados de <i>H. capsulatum</i>	72
Figura 4.1. Predicción de epítopes de clase II para diferentes alelos DR, DP y DQ, para dos proteínas distintivas de <i>H. capsulatum</i>	91
Figura 4.2. Alineamiento de secuencias de dos proteínas de <i>H. capsulatum</i> con sus ortólogos en cuatro especies de hongos cercanos filogenéticamente ..	93

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

Akt o PKB: Protein kinase B

Ag o Ags: Antígeno(s)

Ac o Acs: Anticuerpo(s)

AGID: Agar gel immunodiffusion

ATCC: American type culture collection

BAC1: Bat-associated species-specific clade

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CIB: Corporación para Investigaciones Biológicas

CD: Cluster of differentiation

CD4: Cluster of differentiation 4

CD8: Cluster of differentiation 8

CR: Complement receptor

CPA: Células presentadoras de Ag

Mac1: Macrophage-1 antigen

CFP-10: Culture filtrate protein-10

CDC: Centers for disease control and prevention

CMV: Citomegalovirus

CSA: Crude soluble antigen

CODI: Comité para el desarrollo de la investigación

CM: Carboxymethyl

Cfp4: Proteína 4 del filtrado del cultivo

DC: Célula dendrítica

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

Eng1: Endoglucanasa 1

EIA: Enzyme immunoassay

EORTC/MSG: European Organization for Research and Treatment of
Cancer/Mycoses Study Group

ELISA: Enzyme-Linked immunosorbent assay

ELISPOT: Enzyme linked immunospot

ESAT-6: Early secretory antigenic target-6

EMA: European Medicines Agency

F3: Fragmento 3

FC: Fijación del complemento

FISH: Fluorescence *in situ* hybridization

FDA: Food and Drug Administration

Gal3: Galectina-3

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HPM: Histoplasmosis

HCT: Trasplante de células madre hematopoyéticas

HSP60: Heat shock protein 60

HNP: Defensin Human Neutrophil Peptide

Hc: Histoplasma capsulatum

HLA: Human leukocyte antigen

H2B: Histone 2B

HBcAg: Hepatitis B core antigen

HBsAg: Hepatitis B surface antigen

Hmin: Histoplasmina

HEPES: Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid

His: Histidine

Hsp: Proteínas de estrés térmico

Hsp70: Proteína de estrés térmico 70

INS: Instituto Nacional de Salud

IFI: Infecciones Fúngicas Invasoras

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleukin

iNOS: inducible nitric oxide synthase

Ig: Inmunoglobulina

IDGA: Inmunodifusión en gel de agar

INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

IGRA: Interferon gamma release assay

IMIDs: Immune-mediated inflammatory diseases

kDa: Kilodalton

LAm A y B: Grupos latinoamericanos A y B

LBA: Lavado broncoalveolar

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LAMP: Loop mediated isothermal amplification

M ϕ s: Macrófagos

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MyD88: Myeloid differentiation primary response 88

Mntb: Micobacterias no tuberculosas

Mtb: *Micobacterium tuberculosis*

MRC-5: Medical Research Council 5
NK: Natural killer
NO: Óxido nítrico
NAALADasa: Amino peptidasa alfa N-acetil
Ni: Nickel
NAm1: Norte América 1
NCBI: National Center for Biotechnology Information
OD: Optical density
PMN: Polimorfonuclear Neutrófilo
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
PGE2: Prostaglandin E2
PPD: Purified protein derivative
PHA: Phytohaemagglutinin
PSA-2: Promastigote surface antigen-2
QFT-G: QuantiFERON-TB Gold
QFT-GIT: QuantiFERON Gold In Tube
QFT-Plus: Quantiferon-TB Gold Plus
RJ: Cluster 2 representing the phylogenetic species
rHSP60: Recombinant heat shock protein 60
RI: Respuesta inmune
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RD1: Region of difference 1
RYP1: Required for yeast phase growth
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SOT: Trasplante de órgano sólido

Syk: Spleen tyrosine kinase

SNC: Sistema nervioso central

SLA: Soluble leishmania antigen

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TLR: Toll-like receptors

TB: Tuberculosis

TST: Tuberculosis skin test

Tpi: Time post infection

TB1 y 2: Tubo de ensayo 1 y 2

Th1: T helper cell 1

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UFC: Unidad formadora de colonia

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VLA-5: Very late antigen receptor 5

V β : Variable beta

VZV: Virus varicella-zoster

Yps-3: Yeast phase-specific 3

Introducción general

La histoplasmosis (HPM) es la micosis sistémica endémica más común en el continente americano, pero también ha sido reportada en otros continentes, principalmente en viajeros que visitaron alguna zona endémica. Es producida por la inhalación de las partículas infectantes del hongo dimórfico *H. capsulatum*, cuyo hábitat ecológico se relaciona con guano de murciélago y excretas de aves. La mayoría de los individuos inmunocompetentes que adquieren la infección presentan formas asintomáticas que, si bien pasan desapercibidas, permanecen en el hospedero, dando lugar a infecciones latentes, donde el hongo permanece viable. Estas formas latentes pueden reactivarse si el hospedero tiene alteraciones en su sistema inmune o en su parénquima pulmonar, y, de acuerdo con la severidad de la alteración, el paciente puede desarrollar formas graves de la enfermedad que le pueden ocasionar inclusive su muerte si no es diagnosticado y tratado oportunamente.

Actualmente no existe una prueba de laboratorio que permita la detección precoz y oportuna de infecciones latentes o subclínicas por *H. capsulatum*, dejando sin cobertura diagnóstica a individuos que vayan a ser sometidos a procesos de inmunosupresión, como trasplantes, uso de inhibidores o bloqueadores de citoquinas (anti-TNF- α) o a individuos que sufran inmunosupresión por la infección con el VIH, con el riesgo de desarrollar la micosis en caso de tener una forma latente de infección por *Hc*.

Ante esa necesidad, en este trabajo se abordó, por primera vez, la viabilidad de una prueba tipo IGRA (del inglés: *interferon gamma release assay*) antígeno-específica para *Hc* (que hemos llamado HistoFerón), que permitió discriminar entre individuos no infectados e individuos asintomáticos infectados por el hongo, con una sensibilidad de 92 % y una especificidad de 90 %, comparables con los valores correspondientes informados para las pruebas IGRA disponibles para otros microorganismos, incluso después de décadas de haber ocurrido el evento infeccioso.

En este trabajo también se exploraron y definieron posibles estrategias de desarrollo de una nueva generación de la prueba HistoFerón, orientadas

al uso de antígenos molecularmente definidos que garanticen una alta sensibilidad y especificidad del ensayo. Se realizaron análisis bioinformáticos de los datos genómicos disponibles de varias cepas de *H. capsulatum* y otros microorganismos patogénicos, y se identificó un conjunto de proteínas de *H. capsulatum* que muestran una similitud nula o baja con proteínas de otros patógenos, que pudieran ser utilizadas como antígenos para la nueva prueba HistoFerón.

Estado del arte

1.1 Histoplasmosis

1.1.1 Definición – Antecedentes históricos - Etiología - Agente etiológico – Ecología

La HPM es una micosis endémica sistémica cuyo agente etiológico es el hongo dimórfico *H. capsulatum* (Holbrook y Rappleye, 2008). Fue reportada por primera vez en 1905 por el patólogo Samuel Taylor Darling cuando buscaba casos de leishmaniasis en el área de construcción del canal de Panamá, y encontró, en cortes histológicos de la autopsia de un paciente proveniente de Martinica, numerosos cuerpos intracelulares, similares a los amastigotes o cuerpos de *Leishmania donovani*, pero que carecían del cineto-núcleo y las células estaban rodeadas característicamente por un halo transparente parecido a una cápsula.

Darling consideró que este microorganismo era diferente y que por su similitud podría ser parte del reino protozoario, y lo denominó *H. capsulatum* (Darling, 1908). En 1949, Emmons lo aisló por primera vez del suelo, identificando de esta manera uno de sus nichos ecológicos importantes (Emmons CW, 1949); posteriormente también lograron aislarlo de minas y cavernas. Kwon-Chung, en 1972, reconoció el estado teleomorfo, clasificándolo inicialmente como *Emmonsia capsulata*, y actualmente como *Ajellomyces capsulatus* (Kwon-Chung, 1972).

En los últimos años, y gracias al uso de técnicas moleculares, se ha identificado que *H.capsulatum sensu lato* es un complejo de, al menos, ocho clados geográficamente distribuidos (Australia, Países Bajos, Eurasia, clases de América del Norte 1 y 2, grupos latinoamericanos A y B y África); con excepción del grupo de Eurasia, esos clados son considerados especies filogenéticas (Kasuga et al., 2003). Más recientemente, (Teixeira et al., 2016), apoyados por diferentes métodos basados en marcadores moleculares y de genética de poblaciones, proponen al menos seis nuevas especies filogenéticas

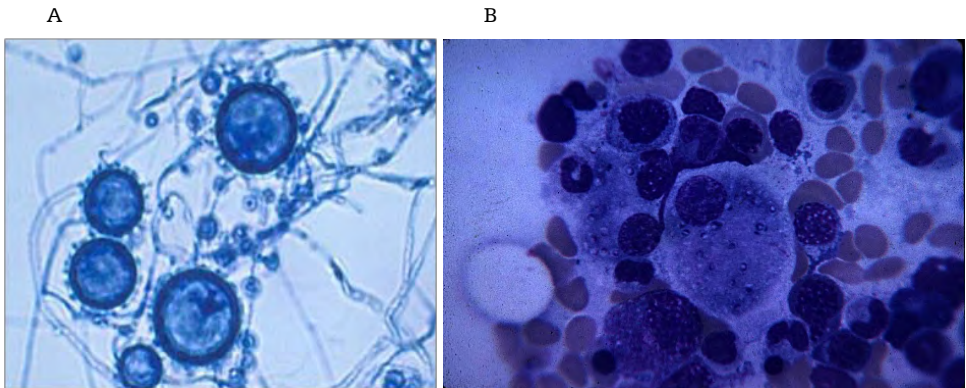
en el complejo de especies de *Histoplasma*, que comprenden las especies filogenéticas: LAm A1, LAm A2, LAm B1, LAm B2, RJ y BAC-1.

Existe otra clasificación de las cepas de *H. capsulatum* de acuerdo con la presencia o no de α - (1,3)-glucano en su pared celular (quimiotipos). Se ha reportado que las cepas del clado Norteamérica 2 no expresan este carbohidrato en su pared lo cual les confiere una mayor virulencia, como fue demostrado en modelos animales (Edwards, et al., 2011; Mayfield y Rine, 2007).

H. capsulatum, como hongo dimórfico, muestra diferentes morfologías reguladas por condiciones ambientales, incluyendo la temperatura y concentraciones de compuestos sulfidrilos y cAMP. En la naturaleza crece como un moho (fase micelial), con hifas septadas, hialinas, delgadas, que producen macroconidias (8-14 μm de diámetro) con proyecciones (tuberculadas), y microconidias (2-5 μm de diámetro) las cuales son consideradas las partículas infectantes (figura 1.1A).

Esta forma se puede cultivar en el laboratorio a temperatura ambiente (20-25 °C). A temperaturas por encima de 35 °C, y en el hospedero mamífero (37 °C), se presenta en forma de levadura (oval, uninucleada, diámetro de 2-5 μm) que *in vivo* se presenta de forma intracelular en los macrófagos (figura 1.1B) (Woods, 2016).

Figura 1.1. Morfología microscópica de *H. capsulatum*



Fuente: A: Biblioteca de Micología Médica Geraldine Kaminski, producido por: David Ellis y Roland Hermanis, Copyright 2003 Doctorfungus Corporation. B: <https://media.cheggcdn.com/media/864/86413751-84e3-40b2-9f95-8a4780493092/histo111335589475253.png>.

Con respecto a la ecología del hongo, *H. capsulatum* se encuentra en suelos de cuevas, galpones y ruinas de edificaciones en las cuales se acumulan

excretas de murciélagos y aves (Queiroz-Telles et al., 2017), así como también en la tierra y otros sustratos orgánicos tales como el compostaje (Gómez et al., 2018a). Estos nichos están caracterizados por su alto contenido de nitrógeno, pH entre 5 y 10, y temperaturas entre 20 y 37 °C (Sifuentes-Osornio, et al., 2012).

El genoma de *H. capsulatum* es haploide, y su fase sexual solo se ha obtenido en el laboratorio (*Emmonsella capsulata*); este fenómeno nunca se ha observado en la naturaleza y, por lo tanto, se desconoce su magnitud (Sepúlveda, et al., 2017). El contenido de guanina y citocina reportado a nivel nuclear es del 47 %. El tamaño del genoma de las cepas de *H. capsulatum* puede oscilar entre 2,3 y 3,2 x10⁷ bp con secuencias repetitivas en el DNA entre 0,5 y 8 % y, además, pueden presentar entre 3 y 7 cromosomas (Carr y Shearer, 1998). En cuanto al perfil de proteínas de *H. capsulatum*, el micelio y la levadura presentan de manera preferencial 214 y 225 proteínas, respectivamente. En el micelio se encontró una alta proporción de enzimas relacionadas con la vía glucolítica y fermentación alcohólica, lo que sugiere un alto uso de la vía anaerobia para la producción de energía, mientras que en la levadura, abundan proteínas involucradas con el ciclo del ácido tricarbóxico y otras que responden al estrés generado por la temperatura. En ambos morfotipos celulares, fueron identificadas proteínas que responden al estrés oxidativo y otras que están involucradas en el metabolismo de la pared celular (Almeida et al., 2021).

1.1.2 Patogenia. Patología. Interacción hospedero – hongo

La infección es adquirida por la inhalación de las microconidias y fragmentos pequeños de hifas de la fase miceliar del hongo, los cuales se suspenden en aerosoles por alteración de su nicho ecológico (Queiroz-Telles et al., 2017; Woods, 2016) importante anotar que no es necesario el contacto directo con los microfocos; las personas pueden ser infectadas con las microconidias que han viajado a grandes distancias debido a las corrientes de aire generadas en el ambiente (Colombo, et al., 2011). Otra fuente de infección a considerar es de tipo endógeno, cuando hay reactivación de focos latentes durante procesos de inmunosupresión (Wheat, 1995).

Una vez inhalada la microconidia, esta se aloja en el alveolo pulmonar donde inicia, en respuesta a la temperatura corporal, la transformación en blastoconidia, que corresponde a la forma tisular del hongo (Holbrook Rappleye, 2008; Woods, 2016). En ese primer contacto es fagocitado el hongo a través de la participación de moléculas CD11 y CD18 presentes en la su-

perficie de polimorfo nucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos, dando inicio en el hospedero a una infección pulmonar primaria, durante la cual el hongo, albergado dentro del fagocito cual “Caballo de Troya”, se disemina desde el pulmón por vía venosa y linfática a otros órganos ricos en células fagocíticas mononucleares, razón por la cual todas las infecciones primarias pueden ser consideradas diseminadas (Holbrook y Rappleye, 2008; Woods, 2016).

En más del 95 % de los hospederos con integridad de su sistema inmune, la infección se resuelve espontáneamente y, aunque la inmunidad celular suele controlar la infección primaria, el foco primario no queda completamente libre de levaduras, y algunas pueden permanecer viables por muchos años en un estado latente y con la capacidad de reactivarse posteriormente (Wheat, 1995).

1.1.3 Epidemiología – Brotes

Actualmente, la HPM es considerada la micosis sistémica más frecuente en el continente americano, donde la frecuencia de positividad a la histoplasmina presenta cifras bastante altas, hasta del 90 % en EUA (valles de los ríos Misisipi y Ohio), 89 % para Brasil (estado de Río Grande del Sur) y del 88,6 % para México (estado de Guerrero) (Scully y Baddley, 2018).

Para otros continentes se reportan zonas endémicas en algunas regiones de África (Sudafrica, Zimbabwe y Tanzania); Asia (valle del río Yangtze en China); y Europa (valle del río Po). En Europa y en otras regiones no endémicas de Estados Unidos también se han reportado casos, debido principalmente a otros factores de la era moderna, tales como el cambio climático a nivel global, la migración humana, el incremento de actividades relacionadas con turismo en zonas rurales, la implementación de la intensa mecanización y el frecuente uso de compuestos fungicidas en la agricultura, factores que han contribuido, de manera significativa, al aumento en la incidencia de la HPM a lo largo de diferentes regiones geográficas (Queiroz-Telles et al., 2017; Scully y Baddley, 2018).

En cuanto a brotes epidémicos de HPM existen múltiples reportes en la literatura, principalmente en EUA y otros países de Centro y Suramérica, pero también de otras partes del mundo, relacionados con viajeros que han visitado zonas endémicas. En la tabla 1.1 se presentan algunos de esos reportes.

Tabla 1.1. Reportes de brotes epidémicos de histoplasmosis

<i>País /año</i>	<i>Características geográficas</i>	<i>Actividad ó Factor de riesgo</i>	<i>N.º de individuos comprometidos</i>	<i>Referencias</i>
USA Revisión de 105 brotes entre 1938 - 2013	26 estados de USA y Puerto Rico	Exposición a aves de corral, renovación o demolición de edificaciones viejas, manipulación o contacto con excretas de aves y murciélagos.	2.850 casos expuestos, de los cuales 285 requirieron hospitalización, 120 recibieron tratamiento antimicótico y 25 murieron.	(Benedict y Mody, 2016)
Colombia. Revisión de 12 brotes entre 1977 y 1994	Seis departamentos del área andina	Visita a cuevas, remoción de tierra, demolición de casa vieja, manipulación abono orgánico (gallinaza), tala de cafetales.	332 personas tuvieron contacto. 11 casos índices. 140 infectadas con el hongo.	(Ordóñez et al., 1997)
México Entre marzo 1 y mayo 31 de 2001	Acapulco	Construcción y remodelación del área de un hotel donde se alojaron la mayoría de los turistas (Hotel H)	757 entrevistados. 262 con cuadro respiratorio febril. 145 casos confirmados por laboratorio. 73 recibieron tratamiento antimicótico. 38 hospitalizados.	(Morgan et al., 2003)
República Dominicana. Julio-Sptbre. de 2015	Construcción de túneles en represa hidroeléctrica	Remoción de guano de murciélagos en la construcción de un túnel, personal sin protección respiratoria (mascarilla).	36 trabajadores inmunocompetentes. 30 con manifestaciones clínicas, 28 hospitalizados, 9 en UCI, 3 murieron.	(Armstrong et al., 2017)
Martinica. Diciembre de 1995	Travesía (10 minutos) por túnel	Tránsito por área con abundante acúmulo de guano por ser sitio infestado de murciélagos. Personas sin protección respiratoria (mascarilla).	13 individuos. Un caso índice y 12 individuos con manifestaciones respiratorias diagnosticadas inicialmente como influenza.	(Salomon et al., 2003)

País /año	Características geográficas	Actividad ó Factor de riesgo	N.º de individuos comprometidos	Referencias
España. Entre marzo de 2001 y abril de 2003	Turistas que visitaron diferentes países de Latinoamérica	Excursiones a lugares abiertos donde acamaron y durmieron al aire libre.	342 individuos. 20 % histoplasmina positiva. 25 presentaron fiebre y 12 tos.	(Gascón et al., 2005)
Israel. Revisión entre los años 2000 y 2011	Visitas a diferentes países de Norte, Centro y Suramérica	Visitas a cuevas infestadas de murciélagos; árbol hueco habitado por murciélagos,	23 viajeros con diagnóstico posterior de HPM probada o probable. 22 viajaron a Centro y Suramérica; uno a Norteamérica. 14 presentaron síntomas respiratorios	(Segel et al., 2015)
África. Septiembre de 2011	Selva tropical cerca de Fort Portal en el oeste de Uganda.	La fuente probable de infección fue un gran árbol hueco infestado de murciélago dentro de la selva que visitaron	24 estudiantes; 13 desarrollaron síntomas respiratorios, 2 fueron hospitalizados (1 en UCI).	(Cottle et al., 2013)
Japón. Noviembre de 2007	Viaje de turismo a la isla de Langkawi, Malasia (cinco días)	Sin ningún factor de riesgo aparente (no hubo visita a cuevas, sin contacto con excretas de aves o murciélagos).	Tres jóvenes japonesas, cuadro respiratorio similar a gripe (fiebre, tos) con alteraciones Rx tórax. Serologías reactivas y PCR específica para <i>H. capsulatum</i> en biopsia pulmonar.	(Ohno et al., 2010)

Fuente: elaboración propia.

En relación con Colombia, infortunadamente, a nivel nacional las micosis no son enfermedades de notificación obligatoria, lo que impide tener datos reales para calcular la incidencia y prevalencia de la HPM en el país; sin embargo, y tratando de conocer al menos la frecuencia de HPM en Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) diseñaron una encuesta para la recolección de información a partir de pacientes con este diagnóstico comprobado. Así, entre 1992 y 2008 se reportaron 434 casos de HPM diagnosticados

en 20 departamentos del país; la mayoría de los pacientes (96,1 %) eran adultos, 77 % hombres con edad promedio de 38,4.

En los adultos, 70,5 % tenían SIDA y en el 29,3 % de estos pacientes la HPM fue una condición definitoria o marcadora de SIDA; el 14,6 % presentó una media de 66,5 ($\pm 82,1$) linfocitos TCD4+/ μ l y solo el 27,6 % recibía terapia antirretroviral (Arango-Bustamante et al., 2013; Arango et al., 2011). Otras condiciones de inmunosupresión representaron el 7 % de los casos, entre las cuales cabe destacar el uso de esteroides, presencia de neoplasia, trasplante, diabetes, cirrosis, alcoholismo y desnutrición (Arango et al., 2011).

Más recientemente en un estudio fue revelado por primera vez que la carga de la HPM asociada al VIH es equivalente en su incidencia e incluso más alta como causa de muerte, cuando se compara con la tuberculosis entre las personas que conviven con VIH en países de América Latina. Los autores estimaron un rango de casos de HPM sintomática asociada al VIH de 6.710-15.657 para el año 2012. Las zonas más afectadas por la prevalencia de la HPM (>30 %) y la incidencia (>1,5 casos por 100 personas que viven con VIH) fueron América Central, el norte de Sur América y Argentina. Estimaron, además, un rango de muertes 671-9394 relacionadas con la HPM comparado con las muertes reportadas por la tuberculosis 5.062 en América Latina (Adenis et al., 2018).

Adicionalmente, nuestro país debe ser considerado zona endémica importante para la HPM por la posible alta frecuencia de primo-infecciones por *H. capsulatum* como es sugerido por (Carmona, 1971) quien revisó 16 estudios realizados en el país, entre 1950 y 1968, con una positividad promedio a la histoplasmina de 21,3 % de la población estudiada. Al extrapolar esos resultados a la población colombiana actual (proyectada para abril 24 de 2018 en 49.587.815 habitantes) tendríamos la alarmante cifra de 10.562.205 individuos potencialmente infectados con *H. capsulatum* y quienes, al ser sometidos a algún proceso de inmunosupresión podrían desarrollar formas severas de la micosis.

1.1.4 Factores y grupos en riesgo para el desarrollo de histoplasmosis

Los factores de riesgo para desarrollar HPM pueden ser agrupados en tres categorías, a saber:

- i) factores epidemiológicos, ii) factores inherentes al hospedero y iii) factores relacionados con el patógeno (hongo) (ver tabla 1.2). La presencia

simultánea de varios de estos factores es clave para el desarrollo de las diferentes formas clínicas de la HPM.

Tabla 1.2. Factores de riesgo para desarrollar histoplasmosis

<i>Factores de riesgo para desarrollar histoplasmosis</i>		
<i>Factores Epidemiológicos</i>	<i>Factores del hospedero</i>	<i>Factores del patógeno (hongo)</i>
Residencia o visitas a áreas endémicas:	VIH / SIDA (recuentos de linfocitos TCD4+	Tamaño y morfotipo del hongo presente en el inóculo.
<ul style="list-style-type: none"> • EUA (principalmente los valles de los ríos Ohio y Misisipi), • América Central, • Suramérica, • Asia (China, valle del río Yangtze) • Oceanía, • África 	<150 células/mm ³ Inhibidores de TNF- α	Virulencia de la cepa
Exposición a aerosoles de guano de murciélagos, pájaros y aves (compostaje) posiblemente contaminados con el hongo.	Extremos de la vida (<2 ó > 70 años)	
Exposición a fuentes generadoras de aerosoles de suelos posiblemente contaminados con el hongo:	Otras causas de supresión o disfunción de la respuesta inmune celular	
<ul style="list-style-type: none"> • Construcciones/demoliciones • Fuertes vientos • Paisajismo/excursiones • Visita a cuevas, cavernas • Manipulación de abonos orgánicos/compostaje 		

Fuente: adaptada y modificada de (Azar y Hage, 2017a).

Es importante resaltar que debido a la pandemia del VIH / SIDA, esta micosis se ha convertido en un problema cada día más serio, que se reporta con mucha mayor frecuencia y gravedad, alcanzando tasas de mortalidad hasta del 39 % en ciertas regiones de los Estados Unidos (Kauffman, 2009) y del 40 % en Guatemala (Scheel et al., 2009).

En la actualidad debido a la pandemia de la COVID-19, los pacientes con VIH / SIDA pueden sufrir co-infecciones de *H. capsulatum* y del virus

SARS-CoV-2 (Basso et al., 2021). Aunque la mayoría de los informes que asocian infecciones fúngicas con COVID-19 han sido casos de aspergilosis invasiva, vale la pena considerar a la histoplasmosis como posibilidad diagnóstica en este contexto, principalmente en áreas endémicas para el hongo (Messina et al., 2020).

Otro grupo de riesgo importante son los pacientes que, teniendo una infección latente asintomática por este hongo, sean sometidos a fármacos inmunosupresores (productos biológicos o quimioterapéuticos), son susceptibles a sufrir una reactivación de esa infección y llegar a desarrollar formas clínicas manifiestas de la micosis, ya que esos fármacos son capaces de disminuir, de manera significativa, la respuesta inmunológica a un estímulo antigénico ya sea producido por un Ag (antígeno) externo o interno. Dichos fármacos se utilizan en la prevención del rechazo a trasplantes (de órgano sólido y de médula ósea), en pacientes con cáncer o neoplasias y en una amplia gama de enfermedades autoinmunes, como la psoriasis, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y otras muchas enfermedades dermatológicas y sistémicas (Díaz, 2008).

Existe una gran variedad de fármacos inmunosupresores con diferentes mecanismos de acción: i) inhibición en la activación de las células T (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus) (Díaz G., 2008), ii) inhibición de la síntesis de ADN y ARN (azatioprina, micofenolato, ciclofosfamida, metotrexato, penicilamina, etc.) (Patel, et al., 2006), iii) antiinflamatorios (corticosteroides) (Taylor, et al., 2005), iv) bloqueadores de factores inmunitarios (Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL-2, CD3, CD25, TNF- α , etc.) (Díaz, 2008), v) acción directa sobre el factor estimulante de colonias, etc.), y vi) otros productos elaborados por recombinación genética que bloquean algunos de los mecanismos implicados en la reacción inmunológica (anti-CD2) (Díaz, 2008).

Son varios los reportes sobre la reactivación de algunas micosis, incluyendo la HPM, por el uso de bloqueadores anti-TNF- α (Lee et al., 2002; Olson et al., 2011; Tsiodras, Samonis, Boumpas, y Kontoyiannis, 2008; Vallabhaneeni y Chiller, 2016; Vergidis et al., 2015). En ese sentido, (Olson et al., 2011) reportan 26 casos de HPM en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide atendidos en un mismo centro por un periodo de 11 años. La mayoría de los pacientes estaban en terapias inmunosupresoras combinadas; 15 estaban con agentes del factor de necrosis tumoral (anti-TNF- α), 15 con corticosteroides y 16 con metotrexato.

Por otra parte, (Tsiodras et al., 2008) publicaron una revisión sobre informes de infecciones fúngicas invasoras (IFI) asociadas con la administración de tres anti-TNF- α (infliximab, etanercept y adalimumab) en un periodo de tiempo significativo (enero / 66 a junio / 2007); estos autores reportaron 281 casos de IFI relacionados con la inhibición de esta citoquina, de los cuales 226 (80 %) recibieron tratamiento con infliximab, 44 (16 %) con etanercept y 11 (4 %) con adalimumab. Las IFI (infecciones fúngicas invasoras) más prevalentes en este tipo de pacientes tratados con bloqueadores del TNF- α fueron: la HPM (n=84, 30 %), la candidiasis y la aspergilosis, ambas en la misma proporción (n=64, 23 %) (Tsiodras et al., 2008).

En relación con los pacientes trasplantados, (Kauffman et al., 2014) publicaron un estudio multicéntrico prospectivo (Transnet, 2001-2006) realizado en 15 instituciones de trasplante de órgano sólido (SOT) y células madre hematopoyéticas (HCT). Reportaron un total de 70 pacientes (64 receptores de SOT y 6 receptores de HCT) que tuvieron infección con una micosis endémica, de los cuales 52 (74,3 %) correspondieron a casos de HPM. Estos resultados son un dato muy significativo, y se debería considerar como protocolo importante, previo a un proceso de trasplante, determinar si existe una infección latente asintomática por *H. capsulatum* en pacientes candidatos a trasplante y en los donantes (Kauffman et al., 2014).

1.1.5 Principales formas clínicas de la HPM

Clínicamente, la infección por *H. capsulatum* produce un amplio espectro de enfermedades que van desde una forma primaria asintomática a una forma diseminada progresiva (Azar y Hage, 2017a). Las manifestaciones clínicas de la HPM son resultado de un proceso multifactorial, ya que dependen de i) el tamaño y frecuencia del inóculo inhalado, ii) el estado inmune del hospedero y el grado de virulencia de la cepa del hongo responsable de la infección (Goodwin, et al., 1981).

Así, la HPM puede presentarse tanto en hospederos inmunocompetentes como en inmunosuprimidos (Arango-Bustamante et al., 2013), como también en aquellos que reciben productos biológicos, dentro de los que se destacan "bloqueadores del factor de necrosis tumoral o anti-TNF α y la calcineurina" (Lee et al., 2002; Olson et al., 2011; Queiroz-Telles et al., 2017; Tsiodras et al., 2008; Vallabhaneni y Chiller, 2016; Vergidis et al., 2015).

1.1.5.1 Primo-infección, forma asintomática

Durante la primera exposición a este hongo, los macrófagos no activados son relativamente ineficaces en la lucha contra la infección. En el transcurso de varios días a dos semanas, las levaduras se replican a nivel intracelular, ocasionan la lisis de las células fagocíticas del hospedero, liberan al hongo que infecta a otras células reclutadas a través de mediadores inflamatorios, y la infección local progresa. En un hospedero inmunocompetente esta infección puede ser subclínica o puede ser levemente sintomática, a menudo, un síndrome similar a la gripe con síntomas respiratorios y sistémicos que son inespecíficos (Woods, 2016). Aproximadamente el 95-97 % de los hospederos inmunocompetentes que se infectan presentan esta forma clínica, y en su mayoría solo son diagnosticados en etapas posteriores de su vida cuando sufren algún tipo de inmunosupresión, lo que resalta la capacidad de latencia del hongo en los tejidos del hospedero (Ashbee et al., 2008; Kauffman, 2007, 2009).

1.1.5.2 Otras formas clínicas de la HPM

Se ha descrito otra serie de procesos patológicos, tales como adenitis, granuloma y fibrosis a nivel mediastinal, que son considerados complicaciones (tempranas o tardías) asociadas a casos de HPM en población joven inmunocompetente (Azar y Hage, 2017a; Hage et al., 2015; Queiroz-Telles et al., 2017). El mecanismo exacto no está bien esclarecido, pero se cree que involucra una respuesta inmune de tipo hipersensibilidad retardada a Ags de *H. capsulatum* (Patel et al., 2015).

En la tabla 1.3 se presentan las principales características de las diferentes formas clínicas de la HPM.

Tabla 1.3. Formas clínicas de histoplasmosis

Forma clínica	Factor(es) de riesgo	Tiempo de evolución	Imágenes Rx tórax	Manifestaciones clínicas	Indicación de tratamiento	Tratamiento	Duración del tratamiento
(asintomática) Primo infección	Hospedero inmuno-competente. Con exposición a un inoculo bajo ó medio del hongo*	NA	Sin alteraciones	Asintomática o se presenta como un cuadro gripal que se resuelve espontáneamente. . Representa aproximadamente 95-97% de los casos de infección con <i>Hc</i> en hospederos inmuno- competentes	No	NA	NA
(epidémica) Pulmonar aguda	Hospedero inmuno-competente. Con exposición a un inoculo alto del hongo*	1 a 2 semanas	Infiltrados difusos bilaterales	Síntomas respiratorios, fiebre, tos, disnea, malestar general, adenopatías de ganglios hiliares y mediastinales. Algunos pacientes presentan síntomas reumatológicos (artritis, artralgias, eritema nodoso)	En casos de enfermedad moderada o severa	Casos severos: Anfotericina B por 1-2 semanas seguido de itraconazol. Casos moderados: itraconazol	12 semanas
Pulmonar crónica	Hospedero con defecto pulmonar estructural. Con exposición a un inoculo del hongo*	Meses a años después del contacto con el inoculo	Cavernas, fibrosis, engrosamiento pleural, calcificaciones	Tos crónica con expectoración, disnea, fiebre, pérdida de peso.	Siempre	Itraconazol	1 a 2 años, hasta resolución o estabilización de hallazgos clínicos y radiológicos
Diseminada progresiva	Hospedero con defecto inmunológico (inmunosupresión). Con exposición a un inoculo del hongo*	1 a 2 semanas ó Reacción endógena de foco latente	Infiltrados retículo- nodulares difusos.	Fiebre, pérdida de peso, hepato / esplenomegalia, pancitopenia, endocarditis, lesiones en mucosas y cutáneas, compromiso meníngeo y adrenal.	Siempre	Casos severos: Anfotericina B por 1-2 semanas seguido de itraconazol. Casos moderados: itraconazol	12 meses seguido de terapia anti- fungica de mantenimiento hasta recuperar estado de inmuno- competencia

*suelos contaminados con excretas de murciélago o aves

Fuente: elaboración propia.

1.1.6 Respuesta Inmune (RI)

El estado del sistema inmune del hospedero es vital para definir el control de la infección (como ocurre en hospederos inmunocompetentes) o el desarrollo de la enfermedad (como ocurre en los pacientes inmunocomprometidos) (Azar y Hage, 2017a; Hage et al., 2015; Horwath et al., 2015; Lee y Lau, 2017; Queiroz-Telles et al., 2017; Woods, 2016).

De acuerdo con (Horwath et al., 2015), la comprensión actual de estos mecanismos es el resultado de un "diálogo continuo" entre las observaciones clínicas y los estudios en modelos animales. Los ratones son un modelo poderoso para estudiar la respuesta inmune a *H. capsulatum*; por lo tanto, a continuación, se presentarán conceptos basados en resultados obtenidos a partir de estudios con ambos hospederos.

1.1.6.1 Respuesta inmune innata

En el proceso de reconocimiento de *H. capsulatum* por parte del hospedero participa una serie de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como el TLR-2 que reconoce la proteína específica de fase levadura Yps-3 (Aravalli et al., 2008); los TLR-7 y TLR-9 que actúan en las células dendríticas, posiblemente reconociendo los ácidos nucleicos de la levadura, y las Dectinas 1 y 2 que reconocen β -glucanos (Ray y Rappleye, 2018).

En cuanto a las células del sistema inmune que participan de la RI innata se destacan:

- i. *Macrófagos (M ϕ s)*: se unen e ingieren la levadura a través de los receptores CD11b/CD18 (CR3) y CD11c/CD18 (CR4), activando vías de señalización de la tirosina-quinasa Syk con la consecuente inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias (Bullock y Wright, 1987; Horwath, Fecher, Deepe, et al., 2015; Ray y Rappleye, 2018). Sin embargo, a pesar de ser un fagocito, el M ϕ no activado es ineficiente en el control de la infección por *H. capsulatum*, y es permisivo para el crecimiento y replicación del microorganismo en su interior (Woods, 2016). Es necesaria la activación con IFN- γ para activar mecanismos antimicrobianos que controlen al hongo; llama la atención que los mecanismos que actúan en el humano (estallido respiratorio) y en el ratón (acidificación del fagosoma) son diferentes (Horwath et al., 2015).
- ii. *Neutrófilos (PMN)*: células inmunes innatas que exhiben una actividad fungistática frente a *H. capsulatum* mediada por la producción de

catepsina G y defensinas (HNP-1, -2 y -3) presentes en los gránulos azurófilos (Horwath et al., 2000). Para realizar el proceso de fagocitosis de la levadura, los PMN requieren que el hongo esté cubierto con una molécula que aumenta su reconocimiento, llamada opsonina, este es reconocido a través de los receptores CD35 (CR1), CD11b/CD18 (CR3), CD16 (FcγRIII)(Newman et al., 1993).

- iii. *Células Dendríticas (DC)*: Estas células presentadoras de Ag (CPA) utilizan el receptor de la fibronectina, VLA-5, para reconocer *H. capsulatum* uniéndose a HSP60 y ciclofilina-A, proceso que activa la vía de las cinasas (ERK/MAPK, PI3K/Akt) que a su vez regulan procesos de proliferación y supervivencia (Horwath et al., 2015). Las DC que expresan el marcador CD103+ (integrina que le confiere capacidad migratoria a órganos linfoides y no linfoides potenciando de esta manera la presentación cruzada por los T CD8 en los nódulos linfoides de drenaje) producen una fuerte respuesta de IFN-γ promoviendo la RI hacia un perfil Th1 (Van Prooyen et al., 2016). Las DC humanas son capaces de eliminar el hongo (actividad fungicida) por mecanismo dependiente de las hidrolasas lisosomales (Gildea et al., 2005).

Estas tres células del sistema inmune son las principales productoras de una serie de citoquinas mediadoras de efectos biológicos en la HPM. Para ello, Mφs y DC, requieren señalización intracelular a través de MyD88 (Coady y Sil, 2015). La producción temprana de IL-12, principalmente por las DC y los PMN, es necesaria para iniciar y amplificar la respuesta de tipo Th1 mediante la estimulación de la síntesis de IFN-γ por parte de linfocitos TCD4+, TCD8+ y células NK. No es este el caso de los Mφs, en los cuales *H. capsulatum* puede inhibir su producción al unirse al complejo CD11b/CD18 (CR3) durante el proceso de internalización del microorganismo (Kroetz y Deepe, 2012).

Las células NK también son activadas por la IL-12 y retroalimentan positivamente este circuito. Estas células contribuyen al control de la infección produciendo IFN-γ y a la formación de granulomas. Adicionalmente, tienen un efecto citotóxico directo sobre el hongo y establecen un puente entre la respuesta innata y adaptativa del hospedero frente al hongo (Mittal et al., 2019). En cuanto al IFN-γ, su principal función es la activación de fagocitos; en Mφs de ratón induce la producción de óxido nítrico (NO) que inhibe el crecimiento intracelular de *H. capsulatum*; asimismo, lo hace a través de la regulación de transportadores de hierro y zinc (Kroetz y Deepe, 2012).

Otra citoquina importante es el TNF- α , el cual es también esencial para el desarrollo de la respuesta protectora durante la infección por *H. capsulatum*. Esta citoquina induce la activación en las células fagocíticas de la vía de las caspasas con la consecuente generación de apoptosis del macrófago infectado (Horwath et al., 2015; Kroetz y Deepe, 2012). La neutralización, la inhibición o el bloqueo de esta citoquina, tanto en modelos animales como en el paciente humano, son considerados factores de riesgo importante para la reactivación de focos latentes y el consecuente desarrollo de una HPM diseminada (Allendoerfer y Deepe, 1998; Lee et al., 2002; Olson et al., 2011; Tsiodras et al., 2008; Vallabhaneni y Chiller, 2016; Vergidis et al., 2015).

Al mismo tiempo, hay otras citoquinas asociadas al perfil Th1 que participan también de la respuesta protectora durante la infección por este hongo, tales como: el GM-CSF que activa mecanismo fungistático relacionado con el secuestro del zinc (Winters et al., 2010) y la IL-1 β cuyo mecanismo de acción, en modelo animal, se asocia con disminución de linfocitos T CD4+, baja expresión de iNOS y altos niveles de IL-4 e IL-10 (Deepe y McGuinness, 2006).

Más recientemente, y a nivel experimental, se ha reportado el rol de la galectina-1 endógena en la respuesta inmune protectora contra *H. capsulatum* la cual está asociada con producción de NO y PGE2 (mediador lipídico importante en la patogénesis de la HPM (Rodrigues et al., 2016).

1.1.6.2 Respuesta inmune adquirida

Esta respuesta se desarrolla a través de la presentación de Ags del hongo a los linfocitos por parte de las DC. Aunque estas células son consideradas las células presentadoras de Ag más potentes y hacen las veces de "puente" entre la RI innata y la RI adquirida, los macrófagos y LB también pueden cumplir esta misma función (Horwath et al., 2015).

Son varios los tipos de Ags de *Hc* que tienen la capacidad de inducir en el hospedero (tanto humano como animal) una RI frente al hongo. La Histoplasmina es un extracto antigénico crudo obtenido de filtrado de cultivo de micelio el cual puede concentrarse por cromatografía de intercambio iónico (Zancopé-Oliveira et al., 1993); también está el filtrado de la fase levadura (Guimarães et al., 2004). Ambos tipos de filtrados contienen los Ags más comunes de *Hc* como son las glicoproteínas M (catalasa de 94 kDa, considerado Ag inmunodominante de *Hc*) y H (β -glicosidasa de 120 kDa) (Deepe y Durose, 1995; Hamilton et al., 1990; Johnson et al., 2002; Zancopé-Oliveira et al., 1993), caracterizadas por su capacidad de estimular RI, tanto celular

como humoral (Harris y Deepe, 1988) y jugar un rol importante en la patogénesis de la HPM (Nosanchuk et al., 2012).

Adicionalmente, están las proteínas de choque térmico (Hsp) del hongo, las cuales son consideradas moléculas ampliamente distribuidas y conservadas evolutivamente; son reguladoras esenciales de diversos procesos metabólicos constitutivos y están notablemente incrementadas durante el estrés. Una Hsp de 62 kDa (Hsp60) de *H. capsulatum* es un antígeno inmunodominante y el principal ligando de superficie para los receptores CR3 en macrófagos (Habich et al., 2006) (HSP, tiene una amplia interacción dependiendo de su localización y temperatura a que se encuentre (Almeida et al., 2021; Guimaraes et al., 2009; Guimarães et al., 2011). Por su parte, la Hsp-70 de *Hc* ha demostrado ser antigénica, pero no es mediadora de protección (Allendoerfer et al., 1996).

Esta respuesta inmune adquirida puede ser de tipo celular o de tipo humoral, dependiendo si es desencadenada por linfocitos T o por Linfocitos B, respectivamente.

1.1.6.2.1 Respuesta inmune celular

Tanto los linfocitos T CD4+ como los CD8+ son considerados necesarios para una efectiva RI contra *H. capsulatum*, (Horwath et al., 2015), lo que explica, de alguna manera, la alta incidencia de la HPM en pacientes inmunosuprimidos, en especial los que están en fase SIDA (Chastain et al., 2017). El desarrollo de una *RI celular tipo Th1* es necesaria para el exitoso control de *H. capsulatum*, lo cual se logra gracias a la producción de IFN- γ por parte de los Linfocitos TCD4+ citoquina que activa en los M ϕ s mecanismos fungistáticos contra el microorganismo; este concepto se corrobora con resultados experimentales en los cuales la depleción de Linfocitos TCD4+ acelera la mortalidad de los animales (Allendörfer et al., 1999).

Importante destacar que no se logra erradicar el hongo el cual establece un tipo de infección latente asintomática, pero que puede persistir por toda la vida, siendo foco potencial de reactivación endógena cuando el hospedero pierde su inmunocompetencia por diferentes causas (SIDA, cáncer, quimioterapia, inmunosupresión por trasplante, inhibidores o bloqueadores de TNF- α , entre otros) (Azar y Hage, 2017a; Kauffman et al., 2014; Lee et al., 2002; Olson et al., 2011; Queiroz-Telles et al., 2017; Tsiodras et al., 2008; Vallabhaneni y Chiller, 2016; Vergidis et al., 2015).

Adicionalmente, se ha reportado la importancia de la *RI celular tipo Th17* en el control de la infección por *H. capsulatum* (Deepe y Gibbons, 2009; Kroetz y Deepe, 2012). La IL-17 ha sido considerada como un requisito para la generación de respuestas inflamatorias y protectoras óptimas en el modelo experimental de HPM; además, la generación de células funcionales IL-17 (+) depende de IL-6 e IL-10. Asimismo, se reportan resultados que establecen la existencia de un eje regulador de IL-17 / IL-23 en la HPM (Deepe y Gibbons, 2009); y la galectina-3 (gal3) actúa como regulador negativo ya que inhibe la producción de estas citoquinas por parte de las DC (Wu et al., 2013). Otro aspecto bastante relevante de este perfil Th17 es que, en modelos experimentales de ratón, está demostrando que surge como una respuesta inmune eficiente frente al hongo, inducida a través de un protocolo de vacunación con levaduras de *H. capsulatum*, aun en hospederos con deficiencia de células TCD4+, ya que inducen células T CD8+ productoras de IL-17 (Tc17) (Nanjappa et al., 2012).

En relación con vacunas, (Travassos y Taborda, 2017) publican revisión sobre epítopes lineales de varios de los agentes fúngicos de las micosis sistémicas humanas, incluyendo *H. capsulatum*, que han sido reportados como candidatos a vacunas. Para este hongo se mencionan dos hallazgos importantes: i) la importancia del fragmento 3 (F3) de la rHSP60 el cual confiere protección; y, ii) la depleción de células T V β 8.1/8.2+ en animales inmunizados con rHSP60 suprime esa protección cuando se hacen retos con dosis letales y subletales del hongo (Travassos y Taborda, 2017).

En contraste, el desarrollo de una *RI celular tipo Th2* exacerba la HPM; las citoquinas de este perfil (IL-4, IL-10) polarizan los M θ s a un fenotipo M2, incapaces de eliminar varios patógenos (Muraille et al., 2014).

1.1.6.2.2 Respuesta inmune humoral

A diferencia de la *RI celular*, la *RI humoral* generalmente se ha considerado tener un papel insignificante en la lucha contra los hongos dimórficos, y las investigaciones en este campo se han centrado, principalmente, en la utilidad del anticuerpo (Ac) para realizar el serodiagnóstico. Así, mediciones cualitativas y semicuantitativas de Ac son clínicamente útiles para el diagnóstico y el pronóstico en estas micosis (Nosanchuk, 2005) (Ver ítem 1.1.8.2.1 de este capítulo: Diagnóstico por el laboratorio-Detección de Ac).

En los pocos trabajos publicados en este campo encontramos que a partir de modelos animales de HPM se ha observado un aumento de linfocitos B

a nivel pulmonar en la 1^a semana posinfección con un pico máximo de Acéricos a los 21 días (Fojtasek et al., 1993). Usando ratones knockout de células B se observó que, si bien no había cambios en la carga fúngica durante la infección primaria, durante la secundaria había un incremento significativo de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y se dificulta la resolución de la infección (Horwath et al., 2015).

En hospederos humanos, la infección por *H. capsulatum* induce un incremento de IgM en las dos primeras semanas posinfección, seguida de producción de IgG e IgA (Nosanchuk, 2005). Los anticuerpos pueden llegar a ser importantes para la activación del complemento (Wheat et al., 2016).

1.1.6.3 Evasión de la respuesta inmune por parte de *H. capsulatum*

Son varias las estrategias que tiene *H. capsulatum* para evadir la RI del hospedero. Inicialmente el hongo "promueve" ser fagocitado por los M ϕ s para ser rápidamente internalizado y reducir así su exposición a elementos externos del sistema inmune del hospedero; para ello, el hongo utiliza los receptores del complemento (CR3 y CR4) y CD11 / CD18 presentes en la superficie de las células fagocíticas (Bullock y Wright, 1987; Horwath et al., 2015; Ray y Rappleye, 2018). Otra estrategia es el "enmascaramiento" del β -(1,3)-glucano presente en la pared celular, por parte de los α -(1,3)-glucano, para evitar ser reconocido por receptores tipo Dectina; también lo hace a través de la secreción de endoglucanasa (Eng1) que remueve estos polisacáridos (Ray y Rappleye, 2018).

Por otra parte, (Kurita et al., 1991) demostraron que, a pesar de que este microorganismo provoca una explosión oxidativa y una fusión de fagosoma-lisosoma dentro del fagosoma, el hongo es capaz de evadir el daño mediado por las especies reactivas del oxígeno y por la lisozima en ensayos realizados a corto plazo. Por otra parte, (Medeiros et al., 2002) reportaron que *H. capsulatum* inhibía la apoptosis de PMN y células mononucleares e inducía una baja expresión de Mac-1 en su superficie, lo cual representa un mecanismo de escape del hongo al retrasar la muerte de la célula hospedera, lograr sobrevivir en su interior y prolongar el proceso inflamatorio. (Horwath et al., 2015) afirman que la levadura está equipada para evadir la muerte intracelular por parte de los fagocitos, con mecanismos para degradar las especies reactivas de oxígeno (ROS), regular el pH lisosomal y capturar nutrientes esenciales.

1.1.7 Diagnósticos diferenciales

La sospecha clínica de HPM, como de la mayoría de las micosis pulmonares, es comúnmente confundida con tuberculosis (TB), lo cual implica un enorme retraso en establecer el diagnóstico correcto y, por ende, administrar el tratamiento adecuado, con el consecuente empeoramiento del paciente (Queiroz-Telles et al., 2017). Otros diagnósticos diferenciales para la HPM se consideran: paracoccidioidomicosis (formas pulmonares y extrapulmonares), leishmaniasis, molusco contagioso y micobacterias atípicas (cuando hay diseminación cutánea), criptococosis (pulmonar y cuando hay compromiso de SNC) (Bonifaz et al., 2011). También se deben tener en consideración para un diagnóstico diferencial algunas de las enfermedades granulomatosas crónicas como la sarcoidosis (Hage et al., 2015).

1.1.8 Diagnóstico por el laboratorio

Para el diagnóstico de la HPM se recomienda un abordaje múltiple, que incluye diferentes pruebas de laboratorio, estudios radiológicos, histopatológicos, evaluación microbiológica y serológica (Azar y Hage, 2017b). Adicionalmente, se debe tener en consideración que la sensibilidad de las pruebas diagnósticas varía de acuerdo con la forma clínica de la micosis que presente el paciente (ver tabla 1.4, traducida de (Hage et al., 2015). De acuerdo con un metaanálisis realizado sobre la eficiencia analítica de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la histoplasmosis diseminada progresiva en pacientes con VIH, se describen datos de especificidad muy variables: para el estudio realizado por el cultivo no existen datos disponibles; las pruebas que detectan anticuerpos arrojan 100 %; los ensayos que detectan el antígeno presentan un 97 %, y para las pruebas moleculares reportan 99 % (Caceres et al., 2019).

Tabla 1.4. Sensibilidad de los métodos diagnósticos de acuerdo con la forma clínica de HPM

<i>Método</i>	<i>HPM diseminada</i>	<i>HPM pulmonar aguda</i>	<i>HPM pulmonar crónica</i>
Determinación de Antígeno	92 % (158)*	83 % (29)	88% (9)
Detección de Anticuerpos	75 % (80)	64 % (28)	83 % (6)
Estudio por patología	76 % (76)	20 % (10)	75 % (4)
Estudio por cultivos	74 % (132)	42 % (19)	67 % (6)

*El número entre paréntesis representa el número de pacientes a los cuales se les realizó la prueba.

Fuente: (Hage et al., 2015).

1.1.8.1 Métodos microbiológicos

El diagnóstico definitivo de la micosis se basa en la demostración del microorganismo ya sea por cultivo, por patología o por citopatología (Azar y Hage, 2017b). Los cultivos presentan una sensibilidad que varía entre 42 % y 74 %, de acuerdo con la forma clínica que presente el paciente (tabla 1.4), y tienen la desventaja que pueden tomar hasta 6 semanas (hongo de crecimiento lento), lo que retrasa el diagnóstico del paciente. Los estudios por patología y citopatología (coloraciones de plata metenamina, hematoxilina-eosina, Wright, Giemsa) dan resultados más rápidos, pero para pacientes con la forma pulmonar aguda presentan una muy baja sensibilidad (20 %, tabla 1.4). El hallazgo histopatológico más característico es la presencia de granulomas, por lo cual la HPM debe ser considerada como diagnóstico diferencial de otros procesos granulomatosos como sarcoidosis, linfomas, infecciones por micobacterias (Hage et al., 2015).

1.1.8.2 Métodos NO microbiológicos

Se refieren a las pruebas de laboratorio donde se detectan biomarcadores que sugieren la presencia del microorganismo; a través de estas pruebas no es posible determinar si el microorganismo está viable ni su cantidad. Sin embargo, estos métodos son muy útiles por su rapidez y alta sensibilidad. Estos métodos se pueden clasificar por su capacidad para detectar: i) anticuerpos (Ac) específicos anti-*Histoplasma* que sugieren una respuesta inmune humoral en el paciente; ii) antígenos (Ag) del hongo que sugieren, según su concentración, la presencia del hongo; ácidos nucleicos que sugieren la presencia del hongo, pero no si este está viable, y iv) respuesta de hipersensibilidad tardía que sugiere una respuesta inmune celular en el hospedero.

1.1.8.2.1 Detección de anticuerpos

Como parte de la RI humoral adquirida, los Ac se producen 2 a 4 semanas después del contacto inicial con el patógeno y pueden persistir durante muchos años, por lo cual hay que tener cierta precaución con la interpretación de los resultados que se obtengan a partir de las pruebas como inmunodifusión (ID), fijación del complemento (FC).

La ID emplea un Ag de *H. capsulatum* tipo Histoplasmina (Ag soluble, crudo, metabólico, obtenido de la fase miceliar del hongo); detecta Acs contra el Ag H (glicoproteína, β -glucosidasa, 10-30 % parte CHO, peso molecular \sim 108 - 120 kDa, punto isoeléctrico 4,5) (Deepe y Durose, 1995) y el Ag M

(Ag inmunodominante del hongo, es una glicoproteína conocida como catalasa B con un peso molecular ~70–94 kDa; los residuos glicosilados son los responsables de la reacción cruzada que se presenta con otros microorganismos) (Zancopé-Oliveira et al., 1999a), dando lugar a la Banda H y a la Banda M, respectivamente. La detección de la Banda M es más frecuente y persiste por años después de la infección activa; la Banda H, por el contrario, se detecta en un 20 % de los casos, indica infección activa y no persiste en el tiempo (Hage et al., 2015).

Para la FC se emplean dos tipos de Ags del hongo: i) Histoplasmina, a partir de fase miceliar (como se describió para la ID), y ii) Ag levadura de *H. capsulatum* (suspensión de levaduras del hongo completas, muertas por tratamiento químico con timerosal). Esta es una prueba semi-cuantitativa cuyos resultados se dan con base al inverso de la mayor dilución del suero que presente una reactividad menor del 50 % de hemólisis (Tenenbergh y Arden Howell, 1948).

La sensibilidad de las pruebas se puede ver afectada por el estado de inmunosupresión que pueda presentar el paciente. En cuanto a su especificidad, estas pruebas serológicas pueden presentar reacción cruzada con otros hongos (*Paracoccidioides* spp, *Coccidioides* spp, *Blastomyces* spp) (Negroni et al., 1976; Wheat et al., 1986).

1.1.8.2.2 Detección de antígenos

Para la detección de Ags del hongo *H. capsulatum* se han desarrollado pruebas de laboratorio tipo EIA (del inglés: *enzyme immunoassay*) las cuales han permitido un gran avance en el diagnóstico rápido, temprano y oportuno de la HPM (Azar y Hage, 2017b; Hage et al., 2015). Así, los Ags del hongo se pueden detectar en suero (antigenemia) o en orina (antigenuria) y por emplear muestras como sangre y orina se consideran métodos no invasivos que emplean muestras de fácil acceso.

Hage y colaboradores publicaron en 2011 un estudio multicéntrico retrospectivo de 158 pacientes con HPM diseminada, en los cuales el Ag urinario fue detectado en el 91,8 % de los casos. La detección de Ag del hongo también es muy útil en otros líquidos corporales; así, la detección de Ag de *H. capsulatum* en muestras de lavado broncoalveolar (LBA) incrementa la sensibilidad del diagnóstico de HPM pulmonar hasta el 93,5% (Hage et al., 2010).

En el caso de formas de HPM diseminadas a SNC, la detección de Ag en LCR ha sido aproximadamente del 80 % (Hage et al., 2015). Por el contrario, para las formas agudas (epidémicas) de la HPM, estas pruebas presentan una baja sensibilidad (30 %).

El desarrollo de este tipo de pruebas ha implicado varias “generaciones” de ensayos mejorando su sensibilidad y especificidad. Actualmente, en Colombia se dispone de un estuche comercial de la marca IMMY (*Histoplasma* Antigen EIA, Ref HAG102) para realizar las determinaciones de antigenuria; dicha prueba tiene una sensibilidad de 95 % y una especificidad de 98 % en la detección de formas diseminadas de la HPM (Cáceres et al., 2018).

1.1.8.2.3 Prueba de hipersensibilidad tardía (histoplasmina)

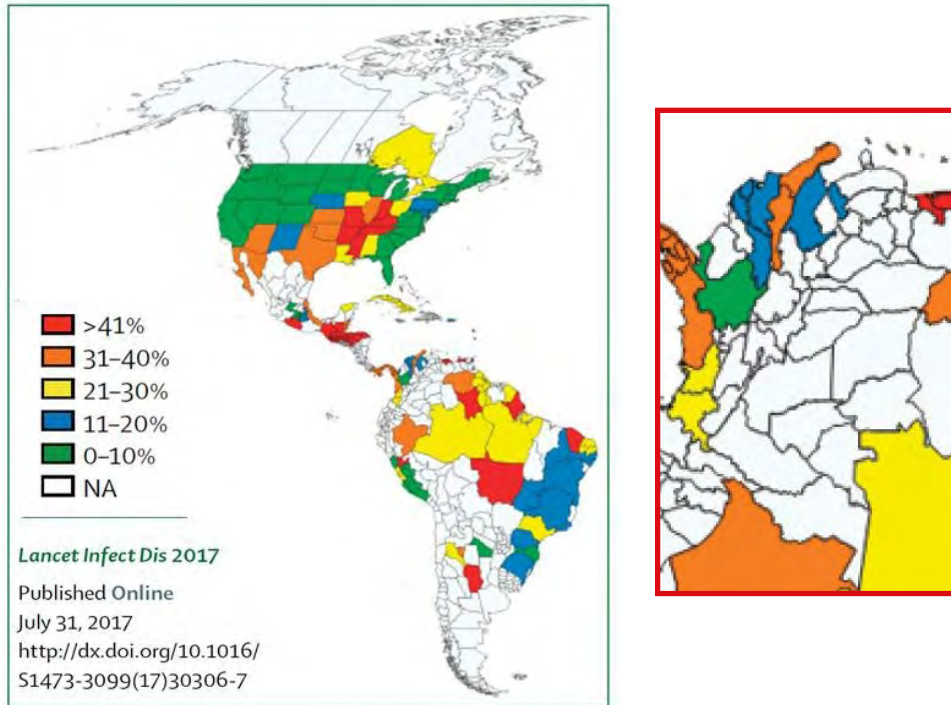
La detección de una posible exposición previa a *H. capsulatum* y la presencia de dicha infección persistente (latente) se ha realizado mediante la reactividad a la prueba cutánea con histoplasmina, una suspensión de Ags fúngicos, que es un marcador de hipersensibilidad de tipo retardado que refleja una RI celular (Woods, 2016). Así, con el uso de la histoplasmina se han detectado las principales áreas endémicas de América, el Caribe y otras regiones del mundo (Scully y Baddley, 2018).

En revisión publicada por (Queiroz-Telles et al., 2017), se presenta un mapa con la distribución según la frecuencia de positividad a la histoplasmina en América y el Caribe, en el cual se tuvieron en cuenta los datos obtenidos a partir de la recopilación de resultados de un total de 95 estudios, realizados en 19 países, entre 1949 y 2009 (figura 1.2).

En la figura 1.2 se puede apreciar la alta positividad (>41 %) en regiones de USA correspondientes a los valles de los ríos Ohio y Mississippi, así como para algunos países de Centroamérica (Guatemala, Honduras y los estados de Chiapas y Guerrero en México). En Suramérica, las mayores áreas endémicas se observan en los estados de Carabobo, Miranda y Sucre en Venezuela; Ceará, Amapá, Roraima y Mato Grosso en Brasil; Huánuco en Perú; y Córdoba en Argentina.

Para Colombia (ver recuadro ampliado a la derecha de la figura 1.2) se destacan altas frecuencias (31 – 40 %) en tres departamentos: Chocó, Guajira y Cesar; frecuencias moderadas (21 – 30 %) en El Valle y Cauca; baja frecuencia (11 - 20%) en Magdalena, Atlántico y Bolívar, y muy baja frecuencia (0 - 10%) en Antioquia.

Figura 1.2. Distribución en América y Colombia de la frecuencia de positividad a la histoplasmina



Fuente: (Queiroz-Telles et al., 2017).

Con respecto a la no disponibilidad actual del uso de la histoplasmina, es importante anotar que, a pesar de la Resolución 620 del 23 de mayo de 2002 (*Diario Oficial* N.º 44.928, de 9 de septiembre de 2002) del Ministerio de Salud de Colombia, donde se adopta el Manual de Normas Farmacológicas que aprueba el uso de preparados biológicos para Pruebas Diagnósticas de micosis (histoplasmina y paracoccidioidina) (página 11 de la Resolución, Numeral 1.2.0.0.N10), a la fecha no hay disponibilidad en Colombia de un producto comercial de Histoplasmina que cumpla con los requisitos del In-vima que se pueda aplicar a la población y permita realizar nuevos estudios para detectar individuos con posible contacto previo con *H. capsulatum* y presentar infección latente por este hongo.

1.1.8.2.4 Detección de ácidos nucleicos (pruebas moleculares)

Estas pruebas son las de más reciente desarrollo, permiten detectar la presencia de ácidos nucleicos de un microorganismo en particular, pero no definen

si el patógeno está vivo o muerto; con las pruebas en tiempo real se puede cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra. Presentan alta sensibilidad y especificidad, acordes con el tipo de prueba y con la selección de la secuencia blanco a detectar.

A la fecha no hay estuches comerciales de pruebas moleculares para *H. capsulatum*; pero es un tema de mucho interés y desarrollo para mejorar el diagnóstico de la HPM, como lo indican (Azar y Hage, 2017b), quienes presentan una revisión de las pruebas "caseras" desarrolladas por diferentes grupos de investigación y publicadas en la literatura, las cuales incluyen pruebas moleculares de varios tipos, a saber: LAMP, PCR simple, PCR anidada, PCR-EIA, PCR en tiempo real, y FISH. Igualmente, han sido varios los "blancos" moleculares empleados (*hcp 100*, región 192bp del gen *GAPDH*, Subunidad 18S ribosomal, *RYP1*, regiones conservadas del gen *NAALADasa*). La sensibilidad de estas pruebas osciló entre 33 % (PCR en tiempo real para regiones conservadas del gen *NAALADasa*) y 100 % (PCR anidada para gen *hcp 100*) (Azar y Hage, 2017b). En cuanto a la especificidad, los valores reportados para los diferentes estudios referenciados en la revisión mencionada oscilan entre 96 % y 100 %.

Según lo reportado por el grupo EORTC / MSG (del inglés: *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group*) (Pauw et al., 2008) las pruebas moleculares para la detección del hongo en muestras clínicas, como la PCR, no han sido aún incluidas en la definición de casos por no ser todavía consideradas como métodos estandarizados ni clínicamente validados (Pauw et al., 2008). Según comunicación personal con David Denning (miembro del grupo EORTC) cuando una prueba molecular, tipo PCR altamente específica para *H. capsulatum*, es positiva en sangre de un paciente con SIDA, debería ser considerado caso probado.

1.1.9 Limitaciones para el diagnóstico de formas asintomáticas

Si bien, las pruebas de laboratorio existentes para el diagnóstico de HPM (descritas en el ítem 1.1.8) presentan valores importantes de sensibilidad que pueden variar de acuerdo con la forma clínica de la micosis que presente el paciente (tabla 1.4) (Hage et al., 2015), ninguna de ellas es adecuada para detectar las formas asintomáticas o latentes de infección por *H. capsulatum*, quedando sin cobertura diagnóstica los individuos asintomáticos que presenten este tipo de infección.

En ese sentido, las pruebas microbiológicas (cultivos, coloraciones o histopatología) no tienen aplicabilidad, ya que, por tratarse de individuos asintomáticos, no hay disponibilidad de muestras clínicas a partir de las cuales realizar estas pruebas. En el caso de las pruebas no microbiológicas, la detección de Ac anti-*Hc* tiene una aplicabilidad relativa ya que los niveles de Ac disminuyen con el transcurrir del tiempo, siendo indetectables en 3-5 años (Aidé, 2009; Fernandez-Andreu et al., 1994). La detección de Ag (antigenuria o antigenemia) solo ha sido demostrada en formas diseminadas de la enfermedad (Azar y Hage, 2017b; Hage et al., 2015); en relación con las pruebas moleculares, la detección de ácidos nucleicos del hongo se ha establecido en pacientes con formas activas de la enfermedad (Azar y Hage, 2017b).

La única prueba que tenía la capacidad de detectar formas asintomáticas o latentes de una infección por *H. capsulatum* era la intradermorreacción con histoplasmina, la cual fue de alto valor epidemiológico (Salvin, 1959); sin embargo, y como ya se mencionó anteriormente, esta prueba ya no está disponible comercialmente y en Colombia no hay reactivo que cumpla con las especificaciones y normativa del Invima.

Por lo anterior, existe la imperiosa necesidad de diseñar pruebas nuevas que permitan detectar, de manera precoz y oportuna, aquellos individuos con las formas latentes o asintomáticas de infección por *H. capsulatum*, individuos que, en caso de sufrir un proceso de inmunosupresión, son potencialmente susceptibles a desarrollar formas activas progresivas de esta micosis, como son aquellos casos que ya se han reportado en individuos sometidos a tratamientos biológicos con bloqueadores o inhibidores del TNF- α (Lee et al., 2002; Olson et al., 2011; Tsiodras et al., 2008; Vallabhaneni y Chiller, 2016; Vergidis et al., 2015).

Un primer abordaje sería explorar las metodologías empleadas para la detección de infecciones latentes o asintomáticas producidas por otros tipos de microorganismos como es el caso de *M. tuberculosis* y CMV. Encontramos que, durante las últimas tres décadas, se ha venido desarrollando un tipo de prueba diagnóstica, dirigida a detectar este tipo de infecciones, denominada "IGRA" (siglas de su nombre en inglés: *interferon gamma release assay*), con capacidad de detectar la presencia de linfocitos T específicos para Ag del patógeno que produce la infección, especialmente si este es intracelular (Sester et al., 2011). La detección de estos linfocitos T específicos representa un marcador indirecto de infección pasada o presente con el microorganismo evaluado (Mack et al., 2009).

1.2 Pruebas Tipo IGRA (*interferon gamma release assay*)

1.2.1 Introducción y antecedentes

La idea de este tipo de prueba (IGRA) surgió por primera vez al inicio de los años 90 y en el campo veterinario, específicamente relacionado con la tuberculosis (TB) bovina. Así, (Wood et al., 1990) teniendo en consideración que: i) los ensayos *in vitro* usados comúnmente para fines de diagnóstico de rutina se basaban únicamente en la respuesta de Ac a agentes infecciosos; y ii) las pruebas *in vivo* de diagnóstico basadas en la respuesta celular se limitaban a las pruebas intradérmicas, desarrollaron un ensayo celular *in vitro* simple y rápido para diagnosticar la TB bovina. El sistema de ensayo se basó en la detección de IFN- γ , que se liberaba por parte de linfocitos T de memoria en respuesta a un Ag específico (Wood et al., 1990).

Posteriormente, se tuvo la misma motivación para los casos humanos de TB para los cuales la prueba TST (siglas en inglés de *tuberculosis skin test*) presentan una baja especificidad (Dunlap et al., 2000), lo cual es debido a que el derivado proteico purificado (PPD, siglas en inglés de *purified protein derivative*) utilizado en esta prueba puede generar una alta reacción cruzada en personas previamente vacunadas con el *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Rutledge et al., 2010) CDC published guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test (QFT-G o en aquellas que se han infectado con micobacterias no tuberculosas (*Mntb*) (Barcellini et al., 2016). Además, la prueba TST tiene implícita una incertidumbre importante en la interpretación de ensayos repetidos, debido en parte a la variabilidad biológica de la respuesta, así como también a las diferencias en la administración del Ag y a la lectura de la induración cutánea resultante (Menzies, 1999).

Las infecciones subclínicas o latentes, como la TB, son causa de las principales complicaciones de salud en individuos inmunocomprometidos. Se estima que cerca de la tercera parte de la población mundial tiene infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (Dye et al., 1999) y de estos, entre 5-15 % desarrollan TB activa. Por tanto, el debilitamiento del sistema inmune es una fuente importante de casos de TB y, en consecuencia, de contagio a otras personas (Getahun et al., 2015).

Debido al peligro de activación de estas infecciones latentes, es importante detectar su presencia en la población, en particular en los individuos inmunocomprometidos y también en aquellos que pueden ser objeto de tratamientos inmunosupresores, por ejemplo, relacionado con un trasplante de órganos.

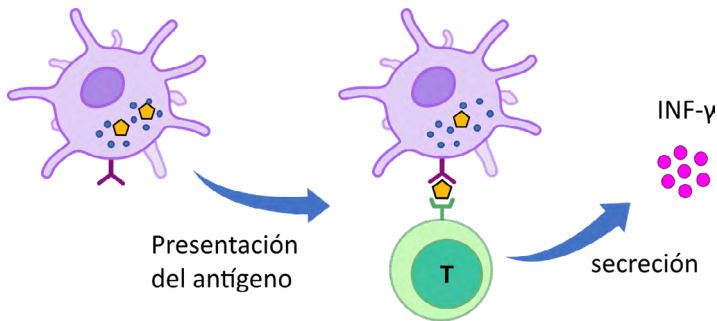
1.2.2 Fundamento de la prueba IGRA

La prueba IGRA tiene como fundamento inmunológico el hecho de que los individuos infectados con un determinado microorganismo desarrollan linfocitos T efectores o de memoria, específicos para Ags de dicho microorganismo, los cuales, al ser re-estimulados *in vitro* con los mismos Ags, producen IFN- γ , citoquina que puede ser cuantificada mediante un inmunoensayo (Whitworth et al., 2013).

La prueba consta de dos etapas:

- 1) Co-cultivar por 24h. sangre periférica del individuo en estudio, con una mezcla de Ag específicos del microorganismo; posteriormente, se recolecta el sobrenadante donde se acumula el IFN- γ producido por las células T Ag-específicas (figura 1.3).

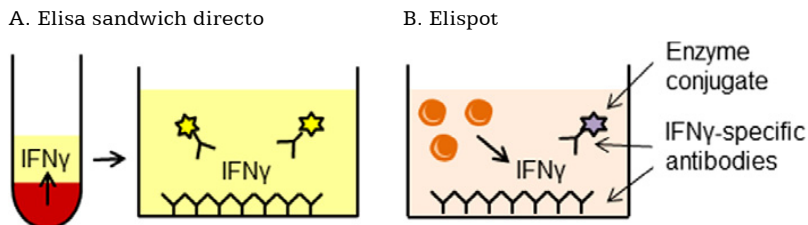
Figura 1.3. Fundamento de la prueba IGRA



Fuente: Valdés, 2022.

Cuantificar el IFN- γ producido por las células T Ag-específicas, presente en el sobrenadante de los co-cultivos, a través de una prueba de ELISA tipo sándwich (figura 1.4A) o un ensayo tipo ELISPOT (siglas en inglés de *enzyme linked immunospot*) (figura 1.4B).

Figura 1.4. Métodos de detección del IFN- γ



Fuente: (Whitworth et al., 2013).

La prueba IGRA se considera “positiva” cuando la cantidad de IFN- γ detectado es mayor al basal (sin estímulo) y sobrepasa un determinado umbral previamente establecido (Whitworth et al., 2013).

1.2.3 Pruebas IGRA en tuberculosis

1231 Desarrollo de las pruebas comerciales

La primera *versión comercial* de una prueba IGRA para detectar infección por *Mtb*, denominada QuantiFERON[®]-TB o QFT, fue desarrollada por la empresa Cellestis (Carnegie, Victoria, Australia) y aprobada, en el año 2001, por la FDA (siglas en inglés de *Food and Drug Administration*), agencia regulatoria de fármacos y alimentos de los Estados Unidos. Esta prueba consiste en la medición de la cantidad de IFN- γ liberado al sobrenadante de un cultivo, realizado a partir de sangre total, en respuesta al estímulo con PPD, por medio de una ELISA realizada en platos de 96 pozos. Este ensayo tiene como desventaja su poca especificidad (Mazurek y Villarino, 2003).

Con el objetivo de aumentar la especificidad de la prueba, se desarrolló una versión mejorada llamada QuantiFERON-TB Gold (QFT-G), la cual recibió la aprobación de la FDA en el año 2005. En esta nueva versión la muestra de sangre total heparinizada es estimulada con una mezcla de péptidos sintéticos que representan dos proteínas de *Mtb*: el Ag 6 de secreción temprana, ESAT-6, (del inglés: *early secretory antigenic target-6*) y la proteína 10 del filtrado del cultivo, CFP-10, (del inglés: *culture filtrate protein-10*). Estos péptidos pueden ser reconocidos por linfocitos T-CD4+ específicos (Aagaard et al., 2004).

Los genes que codifican para las proteínas ESAT-6 y CFP-10 hacen parte de la llamada región diferencial 1, RD1, (del inglés: *region of difference 1*), la cual fue identificada junto con otras 11 regiones más, a partir de un análisis de comparación genómica realizado entre la cepa H37Rv de *Mtb* y varias cepas *M. bovis*-BCG (Mazurek et al., 2005)2005, a new in vitro test, QuantiFERON-TB Gold (QFT-G, Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia. El aumento en la especificidad de esta versión de la prueba IGRA se debe a que las proteínas ESAT-6 y CFP-10 se pierden durante el proceso de atenuación de *M. bovis* en la elaboración de la vacuna BCG y, además, están ausentes en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, excepto en *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum* (Mazurek et al., 2005).

La siguiente generación del ensayo IGRA para TB fue el “QuantiFERON Gold In Tube” (QFT-GIT) (Qiagen, Hilden, Alemania), aprobado por la FDA

en el año 2007. Esta versión incorpora la medición de la respuesta de IFN- γ (también por parte de linfocitos T CD4+) a un tercer Ag, TB7.7 (Rv2654), cuyo gen está localizado en la región diferencial 11 (RD11) del complejo de *Mtb* (Aagaard et al., 2004; Andersen et al., 2000). Esta nueva prueba, además, simplifica el procedimiento del cultivo, realizándolo esta vez en los mismos tubos donde se recolecta la muestra, que están previamente recubiertos con los Ags (Aagaard et al., 2004; Pieterman et al., 2018).

Un año después, en el 2008, la FDA aprobó el ensayo T-Spot-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido), el cual es una variante simplificada de ELISPOT, que detecta el IFN- γ capturándolo directamente alrededor de los linfocitos que lo secretan, antes de que se diluya en el sobrenadante o se degrade. Los Ags utilizados en este ensayo provienen de las proteínas ESAT-6 y CFP-10, y estimulan linfocitos efectores CD4+ y CD8+ (Lalvani, 2007).

Finalmente, en el año 2017 fue aprobado por la FDA el ensayo Cuantiferon-TB Gold Plus (QFT-Plus) (Qiagen, Hilden, Alemania), que detecta respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ a péptidos de los Ag ESAT-6 and CFP-10. En esta prueba se eliminó la evaluación al Ag TB-7.7. En el primer tubo es posible detectar principalmente la respuesta de IFN- γ mediada por linfocitos

T CD4+, mientras que los péptidos en el segundo tubo son capaces de estimular la respuesta de ambos tipos de linfocitos T: CD4+ y CD8+. Resulta interesante que la caracterización por citometría de flujo de los linfocitos T estimulados en ambos tubos mostró que con el tubo 2 se obtienen respuestas T CD4+ tanto para individuos con TB activa como con infección latente, mientras que las respuestas T CD8+ estaban asociadas principalmente a individuos con TB activa (Petruccioli et al., 2016).

1.2.2.3 Sensibilidad y especificidad

Teniendo en consideración que no hay una "prueba de oro" ("*gold standard*") para el diagnóstico de las formas subclínicas o latentes de TB, la mayoría de los estudios han comparado los resultados de las pruebas tipo IGRA con los resultados de la prueba TST, demostrando que las primeras tienen una mayor sensibilidad y especificidad comparadas con la segunda (Barth et al., 2008).

La sensibilidad de las pruebas IGRA ha sido estimada en pacientes con TB pulmonar microbiológicamente confirmada (controles positivos), mientras que la especificidad se ha calculado en individuos de países de baja ende-

micidad con alta proporción de vacunación con BCG (controles negativos) (Barcellini et al., 2016).

La guía de la prueba IGRA para la detección de infección latente por *Mtb*, publicada por el CDC en el 2010, revela que el QFT-GIT y el T-Spot-TB presentaron una sensibilidad consenso de 83 % y 90 %, respectivamente, similar a la informada para la prueba TST, de 89 % (Rutledge et al., 2010) CDC published guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test (QFT-G. En ese mismo documento se informa, además, una especificidad consenso mayor para el QFT-GIT (99 %) y el T-Spot-TB (88%) que la obtenida en la prueba TST (86 %), en una población de personas con poca probabilidad de tener infección por *Mtb* (Rutledge et al., 2010).

En un estudio donde fueron evaluados pacientes con sospecha clínica de TB, respaldada por una mejoría clínica y radiológica después de aplicar el tratamiento antituberculoso, con baciloscopia negativa y cultivo positivo en varios casos, y sin VIH al momento de ser ingresados al estudio, se obtuvo una sensibilidad de 86 % para el QFT-G-IT, significativamente mayor que la obtenida por la prueba TST (62 %) (Bartu et al., 2008). Este estudio demostró una mayor utilidad del QFT-GIT en detectar individuos con TB activa, comparado con la prueba TST, sobre todo en aquellos casos donde es difícil establecer un diagnóstico convencional y es inapropiado tomar la decisión de aplicar el tratamiento antituberculoso, debido a los serios efectos adversos que puede ocasionar (Bartu et al., 2008). Sin embargo, es importante resaltar que, el QFT-GIT no constituye un estándar de diagnóstico para TB activa; es simplemente otra herramienta complementaria para el diagnóstico, que puede ser altamente efectiva en muchas situaciones (Bartu et al., 2008).

En otro estudio realizado en el Hospital Nacional de Tuberculosis de Masan, en Korea, se evaluó la utilidad del QFT-GIT en el diagnóstico de infección latente por *Mtb*, hallándose una correlación entre la respuesta de IFN- γ a los Ags específicos de *Mtb* y el nivel de riesgo de exposición de tres poblaciones diferentes de individuos (Eum et al., 2008). En efecto, se obtuvo una proporción creciente de respuesta de IFN- γ , de 10 %, 52 % y 79 % en estudiantes de medicina, enfermeras y pacientes con TB activa, respectivamente, en correspondencia con la intensidad de la exposición a *Mtb*.

Esta respuesta también fue proporcional a la frecuencia de exposición, obteniéndose una mayor respuesta de IFN- γ en aquellas enfermeras que tenían más tiempo de empleo en el hospital (Eum et al., 2008). En conclusión, la prueba QFT-GIT mostró capacidad de diferenciar los individuos sanos vacunados

con BCG y con bajo riesgo de exposición a *Mtb*, de pacientes con TB, por lo que puede ser útil como herramienta para el diagnóstico de infección latente en individuos vacunados con BCG (Eum et al., 2008).

1.2.3.3 Reproducibilidad y variabilidad

Tagmouti y colaboradores (Tagmouti et al., 2014) revisaron los programas de tamizaje ocupacional de varias instituciones y observaron un número considerable de conversiones (cambios de resultado negativo a positivo) y reversiones (cambios de resultado positivo a negativo) alrededor del punto de corte de las pruebas IGRA disponibles comercialmente en el momento, QFT-GIT y T-Spot-TB. El rango estimado de la variabilidad en la respuesta de IFN- γ detectada en estas pruebas, especialmente en el ensayo QFT-GIT, fue de $\pm 0,47$ UI/ml (coeficiente de variación = 13 %) en el mismo tipo de prueba realizada bajo condiciones idénticas, es decir, en una misma muestra del mismo individuo (Tagmouti et al., 2014).

Por otro lado, en individuos con una respuesta inicial de IFN- γ en los límites del rango (0,25-0,80 UI/ml), se detectó una variación de $\pm 0,26$ UI/ml (coeficiente de variación = 30 %). Esta evaluación incluyó el cambio al mismo tiempo de uno o más componentes en la prueba, sobre la misma muestra de un mismo individuo. La variabilidad en condiciones no controladas fue $\pm 1,4$ UI/ml (coeficiente de variación = 60 %). Esta variación, influenciada por diferentes condiciones presentadas en el montaje de una segunda muestra del mismo individuo, fue detectada al mes de la primera cuantificación. En resumen, diferentes condiciones como el volumen de la muestra, retraso en el tiempo de incubación con los Ag, y la realización de la ELISA por diferentes operadores constituyen fuentes importantes de variación (Tagmouti et al., 2014).

La concordancia entre las pruebas TST e IGRA varía ampliamente y ha sido afectada por los criterios de interpretación de la prueba, prevalencia de la infección, proporción de los individuos infectados que fueron microbiológicamente confirmados, la estimación del tiempo de exposición, edad, raza, vacunación previa con BCG, reciente aplicación de la prueba TST, enfermedades coexistentes dentro de las que se incluyen la infección por *Mtb* y, finalmente, por la presencia de condiciones de inmunosupresión como la ocasionada por el VIH (Arend et al., 2007; Choi et al., 2008).

Por otro lado, existe cierto nivel de incertidumbre en la reproducibilidad de la prueba IGRA y en su significado clínico, especialmente en los estudios

longitudinales en donde se realizan evaluaciones seriadas con la prueba a un mismo individuo a través del tiempo (Hill et al., 2007). La variabilidad del IFN- γ medido a través del tiempo puede ser ocasionada por la falta de precisión de la prueba o por la variabilidad biológica presente en el individuo (Ewer et al., 2006; Pai et al., 2006).

Lo difícil de estas variaciones es que pueden causar cambios en la interpretación final de la prueba, de negativa a positiva (conversión) o de positiva a negativa (reversión), especialmente cuando la respuesta del IFN- γ está cerca del punto de corte (Pai et al., 2009). Para caracterizar mejor la variabilidad en la respuesta del IFN- γ es necesario realizar estudios controlados y establecer criterios que permitan distinguir la variabilidad no específica de aquella que puede ser asociada a una nueva infección o por el control de esta (Rutledge et al., 2010).

1.2.3.4. Mejoramiento de las pruebas IGRA y nuevas plataformas basadas en células T

Las pruebas tipo IGRA han permitido mejorar sustancialmente la especificidad en la detección de los individuos que han tenido contacto con *Mtb*, no obstante, aún no es posible discriminar entre una infección pasada y una actual. Esto ha motivado la búsqueda de biomarcadores inmunológicos adicionales a través de la implementación de metodologías más sensibles e integrales que permitan alcanzar tal objetivo (Borgström et al., 2012) but cannot discriminate between recent or remote TB infection. Here the Flow-cytometric Assay for Specific Cell-mediated Immune-response in Activated whole blood (FASCIA.

En el estudio realizado por Borgström y colaboradores (Borgström et al., 2012) (FASCIA, se evaluó por citometría de flujo la respuesta proliferativa de los linfocitos T, estimulados con los Ag ESAT-6 y CFP-10, en un cultivo de 6 días con sangre total, en individuos que previamente estuvieron o no en contacto con *Mtb*, combinando este análisis con la cuantificación simultánea de 14 citoquinas y quimioquinas. Los individuos estudiados fueron: pacientes con sospecha clínica, TB pulmonar activa comprobada microbiológicamente, TB extrapulmonar, TB clínica, presunta infección latente por *Mtb*, pacientes con otras condiciones diferentes a la TB y controles sanos.

Los resultados mostraron niveles significativamente altos de IFN- γ , IP-10, MIP-1 β , IL-2, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13 y GM-CSF en individuos con TB activa, en comparación con los individuos con infección latente por *Mtb*, y la

diferencia fue aún mayor al comparar con los controles sanos ($p < 0,05$). Estos resultados correlacionan con la respuesta proliferativa de los linfocitos T.

En el análisis realizado por estos investigadores, se sugiere a IP-10 como un marcador más sensible que el IFN- γ ($p = 0,012$) para la detección de individuos con TB activa microbiológicamente confirmada (Borgström et al., 2012).

1.2.4. Aplicación de ensayos tipo IGRA en otros modelos

Citomegalovirus. La prueba QuantiFERON-CMV (QIAGEN, Hilden, Alemania), aprobada recientemente por la FDA (en el año 2017), es el único ensayo de tipo IGRA disponible comercialmente para una infección distinta a la TB. En esta prueba los linfocitos T CD8+ son estimulados con péptidos de las proteínas virales pp65, pp50, gB y IE-1, específicos para un amplio panel de alelos del complejo de histocompatibilidad tipo I (HLA-I) (Giulieri y Manuel, 2011).

Diferentes estudios han demostrado que existe una alta correlación entre la falla de la respuesta inmune celular del hospedero (medida por la baja producción de IFN- γ empleando la prueba QuantiFERON-CMV), y la exacerbación de la virosis en pacientes inmunocomprometidos (Kro et al., 2017; Lochmanova et al., 2010).

La infección por CMV representa una preocupación en la población de mujeres embarazadas, debido a que produce infección congénita que conlleva a defectos neurosensoriales y sordera en los recién nacidos (Saldan et al., 2016) including deafness. Recently, cell-mediated immunity (CMI. Recientemente ha sido demostrado que la inmunidad mediada por células en mujeres embarazadas correlaciona muy bien, aunque de manera inversa, con la transmisión congénita del CMV. Las pruebas IGRA, ELISPOT-CMV y especialmente QuantiFERON-CMV permitieron diferenciar eficientemente la infección primaria de la no primaria (Saldan et al., 2016).

En pacientes sometidos a trasplantes de órganos, la determinación de la respuesta inmune celular del receptor del trasplante mediante las pruebas IGRA, junto con la determinación de la carga de ADN de CMV, se presenta como una estrategia promisoría para identificar y estratificar el riesgo de desarrollar la enfermedad viral, y para individualizar estrategias preventivas (Giulieri y Manuel, 2011; Kro G et al., 2017; Lochmanova et al., 2010).

Leishmania. Turgay y colaboradores (Turgay et al., 2010) and cutaneous (N = 20 evaluaron el uso de la técnica de QuantiFERON con el Ag Histona B2 del parásito para identificar la exposición a *Leishmania*, obteniendo altas

respuestas de IFN- γ en la mayoría de los casos viejos de leishmaniasis tratados, pero no en los controles. No obstante, los propios autores sugieren la necesidad de otros estudios con un mayor número de individuos en cada grupo, para poder establecer el verdadero potencial de la prueba (Turgay et al., 2010).

En otro estudio se empleó igualmente la técnica de Quantiferon, pero con cinco Ags específicos de *Leishmania* [péptidos de H2B, H2B-PSA2 y H2B-Lepp12, Ag crudo soluble después de la lisis del microorganismo (CSA, del inglés: *crude soluble antigen*) y Ag de *Leishmania* soluble (SLA, del inglés: *soluble Leishmania antigen*)] en pacientes con la forma activa de la enfermedad, curados, controles sanos de la zona endémica, y controles sanos de zona no-endémica. Los resultados mostraron que el mejor Ag para la prueba fue el SLA, con una sensibilidad del 80 % y una especificidad del 100 % (Gidwani et al., 2011).

Virus de la hepatitis B. Dammermann y colaboradores (Dammermann et al., 2015) realizaron un estudio con la técnica del Quantiferón en pacientes con el virus de la hepatitis B y en individuos sanos vacunados. Como resultado encontraron que la prueba fue capaz de diferenciar de manera confiable entre pacientes con hepatitis B, individuos vacunados, y controles sanos no vacunados.

En los pacientes con hepatitis B aguda se observó una mayor respuesta de IFN- γ y de IL-2 a los péptidos sintéticos que representan al Ag central del virus de la hepatitis B (HBcAg, del inglés: *hepatitis B core antigen*) en comparación con los otros grupos. Por otro lado, el estímulo con los péptidos que representan al Ag de superficie de la hepatitis B (HBsAg, del inglés: *hepatitis B surface antigen*) condujo igualmente al incremento de IFN- γ e IL-2 en el grupo con hepatitis B aguda, pero también en los controles sanos vacunados, y en estos últimos con valores más altos, indicando una alta tasa de vacunación.

Los péptidos de HBsAg indujeron poca o ninguna respuesta de IFN- γ o de IL-2 en los individuos con hepatitis B crónica, con o sin tratamiento. Para los controles sanos, la liberación de IL-2 después del estímulo con HBsAg demuestra también el estado de vacunación, con una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 85 % y 90 %, respectivamente. Esta versión de la prueba IGRA podría entonces considerarse como una herramienta de tamizaje para la inmunidad celular específica por el virus, como alternativa a los ensayos de citometría de flujo y Elispot (Dammermann et al., 2015).

H. capsulatum. Larue y colaboradores realizaron un primer intento para determinar si una prueba IGRA era útil en detectar individuos asintomáticos infectados con este microorganismo. El trabajo fue presentado en Filadelfia en el año 2014 en el foro abierto de enfermedades infecciosas (ID week); en él describen que, las células mononucleares de sangre periférica de dos voluntarios sanos provenientes de áreas endémicas, con evidencia de infección latente por *H. capsulatum* respondieron al estímulo con lisado de levaduras del hongo de la cepa G217B liberando niveles de IFN- γ entre 25-50 pg/mL en el cultivo y generando 100 "Spot-Forming Units" SFU por 10^5 células en comparación con individuos no expuestos al hongo. Si bien los resultados son positivos, el tamaño de la muestra es realmente pequeño y no permite inferir la capacidad real de este método para discriminar entre individuos expuestos y no expuestos al hongo; esto puede explicar la no publicación de los resultados en una revista indexada.

Otros modelos. El Quantiferon ha sido probado también en otros modelos infecciosos de microorganismos intracelulares obligados o facultativos, utilizando una gran variedad de Ag: i) *Virus varicella-zoster* (Ag del VZV secretados al sobrenadante del cultivo por las células MRC-5 infectadas (Smith et al., 2001) *Toxoplasma gondii* (Ag de secreción del parásito, sensibilidad 94 % y especificidad 98 %) (Chapey et al., 2010); iii) *Mycobacterium leprae* (Ag crudo, proteínas de la pared, Ag purificados de 18, 65 y 70 KDa) (Weir et al., 1994); y iv) *virus 1 de inmunodeficiencia humana* (proteína p24 del virus secretado al sobrenadante del cultivo por una línea de células T CD4+ humanas infectadas; proteínas recombinantes p24 y glicoproteína gp120 y péptidos sintéticos derivados de los Ag gp120, gp41, p25) (Hober et al., 2000). El cuadro 1 resume los aspectos más importantes del contexto en que se desarrolla la presente investigación.

Cuadro 1. Conceptos que destacar (“*Highlight points*”)

- A nivel mundial, el continente americano es la principal zona endémica para la HPM; sin embargo, ya se reportan casos en diferentes regiones geográficas de otros continentes.
 - En Colombia, la frecuencia de primo-infecciones es muy alta (un promedio de 21,3 % de positividad a la histoplasmina), calculándose, con base a la población total actual, que hay más de 10 millones de individuos probablemente infectados por *H. capsulatum*.
 - Aproximadamente el 95-97 % de los hospederos inmunocompetentes que se infectan presentan primo-infección asintomática, en su mayoría solo son diagnosticados en etapas posteriores de su vida cuando sufren algún tipo de inmunosupresión lo que resalta la capacidad de latencia del hongo en los tejidos del hospedero.
 - Las pruebas de laboratorio existentes no tienen capacidad para detectar las formas latentes y asintomáticas de infección por *H. capsulatum*, creándose la necesidad de diseñar pruebas nuevas para detectar oportunamente dichos estadios de la infección.
 - Las pruebas de tipo “IGRA”, (del inglés: *interferon gamma release assay*), tienen la capacidad de detectar linfocitos T, efectores o de memoria, específicos por Ag de un determinado patógeno que produce la infección, y diagnosticar así posibles infecciones latentes.
 - Existen en el mercado estuches comerciales de pruebas tipo IGRA para el estudio de infecciones latentes por *Mycobacterium tuberculosis* (QuantiFERON) y por citomegalovirus (QuantiFERON-CMV).
-

Fuente: elaboración propia.

Abordaje del problema

2.1 Planteamiento del problema

En la actualidad no existe una prueba de laboratorio que permita detectar, de manera precoz y oportuna, infecciones subclínicas o latentes por el hongo dimórfico *H. capsulatum*, agente causal de la HPM, considerada como la micosis sistémica endémica más frecuente del Continente Americano, incluyendo Colombia (Scully y Baddley, 2018). En nuestro país se han reportado 12 brotes de HPM ocurridos en seis departamentos ubicados en el área andina, entre los cuales está el departamento de Antioquia (Ordóñez et al., 1997); de los 332 individuos que estuvieron en contacto con los focos infecciosos fueron identificadas 140 personas infectadas por medio de pruebas inmunológicas; además, se recuperó *H. capsulatum* en 5 de los 8 brotes en los que fue posible procesar muestras ambientales (Ordóñez et al., 1997).

En relación con la frecuencia de primo-infección con *H. capsulatum* en Colombia, Carmona Fonseca, en 1971 (Carmona, 1971), revisó 16 estudios realizados entre 1950 y 1968 en 33 ciudades y pueblos de Colombia en los que emplearon la prueba intradérmica con histoplasmina para determinar el nivel de exposición a este hongo en nuestro país. Este autor encontró una positividad promedio en todo el territorio nacional de 21,3 % (con una mínima de 0,9 % en Coconuco, Cauca y una máxima del 68 % en Quibdó, Chocó); en Medellín la positividad fue del 25,1 % (Carmona, 1971). Con base en los hallazgos reportados en esos estudios, se estima que actualmente en Colombia puede haber más de 10 millones de individuos potencialmente infectados con *H. capsulatum*, y quienes, al ser sometidos a un proceso de inmunosupresión, podrían desarrollar formas severas de esta micosis que podrían llevar a la muerte a estos pacientes.

En ese sentido, la pandemia del VIH / SIDA ha convertido esta micosis (HPM) en un problema de salud pública, que reporta frecuencias más altas y presenta casos de mayor gravedad, al alcanzar tasas de mortalidad hasta del

39 % en ciertas regiones de los Estados Unidos (Carol A. Kauffman, 2009) y del 33 % en Colombia (Cáceres et al., 2012; Tobon et al., 2005).

En la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB (Medellín, Colombia), se realizó un estudio retrospectivo de los casos de HPM en 20 años (1987-2007), durante los cuales se diagnosticaron 391 casos nuevos de HPM, y de ellos el 47,1 % correspondió a pacientes infectados con el VIH, estudio que mostró además un aumento significativo de casos nuevos en los últimos años (Arango-Bustamante et al., 2013). En otro estudio a nivel nacional Arango y colaboradores reportaron una co-infección con VIH del 70,5 % en la población adulta (Arango et al., 2011).

Asimismo, la HPM se ha reportado como la principal infección micótica que complica los pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores como los bloqueadores del factor de necrosis tumoral o anti-TNF (Vergidis et al., 2015), o los pacientes sometidos a procesos de trasplantes (Kauffman et al., 2014).

Además, también se han reportado casos de HPM en individuos inmunocompetentes residentes en zonas endémicas como fue el estudio realizado por (Sathapatayavongs, Batteiger et al., 1983) en Indianápolis, Estados Unidos, el cual reportó un 17 % de mortalidad.

Finalmente, es importante anotar que actualmente no se pueden hacer intradermorreacciones con antígenos de este hongo, ya que no hay disponible ningún producto comercial que esté autorizado por el Invima, ni siquiera a nivel mundial, para realizar dicha prueba. Se hace imperativo entonces contar con una prueba de laboratorio, no invasiva, que nos permita detectar de manera precoz y oportuna infecciones subclínicas o latentes por *H. capsulatum*, para prevenir el desarrollo futuro de formas activas y severas de esta micosis.

Tomando como ejemplo otras infecciones subclínicas, como es el caso de la TB, y el citomegalovirus (CMV), recientemente se han descrito pruebas tipo IGRA (del inglés: *interferon gamma release assays*) con las cuales se puede detectar la infección latente o subclínica en individuos asintomáticos a través de la activación de sus linfocitos T de memoria, los cuales, al ser retados *in vitro* con Ag específicos para cada uno de estos microorganismos, pueden responder con la producción de citoquinas, en especial del IFN- γ , durante el proceso de la respuesta inmune celular específica del hospedero (Giulieri y Manuel, 2011; Whitworth et al., 2013).

Así, individuos previamente expuestos a un determinado microorganismo, en este caso al *H. capsulatum*, quedan con linfocitos T efectores o de memoria, Ag-específicos, circulantes, los cuales al ser re-estimulados *in vitro*, con esos mismos Ags, responderán produciendo cantidades significativas de IFN- γ que permitirán determinar, de forma reproducible, si una persona está o no infectada con este hongo.

2.2 Justificación

El control de cualquier enfermedad infecciosa está en ser capaces de diagnosticar precozmente, tratar y hacer seguimiento a personas con infección latente antes de que se desarrolle la enfermedad activa. De esta manera, y adicional a los beneficios en salud que tendrán los pacientes, se podrían evitar entre otros aspectos, secuelas irreversibles para el paciente, gastos innecesarios desencadenados por la enfermedad misma, la inestabilidad familiar del paciente, la pérdida de días productivos laborales y los costos al sistema de salud.

Por lo tanto, resulta de especial interés poder contar con una prueba que permita diagnosticar infección subclínica o latente por *H. capsulatum* en individuos asintomáticos que han sido expuestos al hongo, y hacerlo de una manera precoz y oportuna antes de que dichas personas desarrollen la enfermedad activa con formas muy severas que llevan a la muerte del paciente inmunosuprimido, como está ocurriendo actualmente.

En ese sentido, con el presente estudio nos propusimos desarrollar una prueba tipo IGRA, que, por estar basada en Ag específicos de *H. capsulatum*, llamaremos HistoFerón. Los Ags seleccionados deben ser capaces de estimular, de manera específica, una alta liberación de IFN- γ por parte de los linfocitos T de sangre periférica de individuos asintomáticos, pero infectados con el hongo, y permitir discriminarlos de individuos igualmente asintomáticos no infectado con *H. capsulatum*, cuya producción de la citoquina debe ser baja.

Esta prueba (HistoFerón) se convertiría en una nueva herramienta de diagnóstico, específica, sensible y enfocada a detectar oportunamente personas inmunocompetentes asintomáticas infectadas con *H. capsulatum*, para prevenir el desarrollo futuro de formas activas y severas de esta micosis, principalmente en individuos que se expongan a ambientes con mayor probabilidad de presencia del hongo o que sean blanco de procesos inmunosupresores directos o indirectos.

2.3 Hipótesis

La nueva prueba HistoFerón permite discriminar entre individuos asintomáticos no infectados de individuos igualmente asintomáticos, pero infectados por el hongo *H. Capsulatum* (infecciones latentes o asintomáticas).

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Desarrollar una prueba de liberación de IFN- γ , IGRA, Ag-específica (que llamaremos HistoFerón) para detectar precoz y oportunamente individuos con infección subclínica o latente por *H. capsulatum*.

2.4.2 Objetivos específicos

2.4.2.1 Diseñar un ensayo clínico para evaluar la nueva prueba IGRA específica para *H. capsulatum* (HistoFerón).

2.4.2.2 Evaluar la respuesta de IFN- γ liberado por linfocitos T frente a antígenos de secreción de las fases micelial y de levadura de *H. capsulatum* en individuos expuestos y no expuestos al hongo.

2.4.2.3 Determinar cuáles son los preparados antigénicos que permiten una mayor sensibilidad y especificidad de la prueba HistoFerón, y proponer un protocolo preliminar para la primera generación de esta prueba.

2.4.2.4 Explorar por métodos bioinformáticos posibles diseños de una futura generación de la prueba HistoFerón con antígenos molecularmente definidos.

Ensayo de liberación de interferón gamma específico para *Histoplasma capsulatum* para detectar individuos infectados asintomáticos: Una prueba de concepto

3.1 Resumen

La HPM es la micosis endémica más común en las Américas. Actualmente, no existe una prueba de laboratorio capaz de detectar infecciones subclínicas o latentes por *H.capsulatum*, que pueden desarrollarse como infecciones graves en individuos inmunocomprometidos. En este trabajo exploramos, hasta donde sabemos por primera vez, la idoneidad de un ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA) para detectar infección latente de *H. capsulatum* en individuos asintomáticos.

Se estudió una cohorte de 126 voluntarios, 13 de los cuales se infectaron con *H. capsulatum* en el pasado y 93 describieron factores de riesgo para esta infección. Los 20 participantes restantes no mencionaron ningún factor de riesgo de infección por *H. capsulatum*, pero ocho de ellos mostraron evidencias de infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Todos los participantes fueron reclutados en Medellín, Colombia, entre enero/2014 y diciembre/2017. Se cultivaron muestras de sangre completa de manera independiente con cuatro antígenos crudos de *H. capsulatum* diferentes y fitohemaglutinina como control positivo.

El IFN- γ liberado por los linfocitos T tras la estimulación con el antígeno se cuantificó mediante ELISA. Un valor de corte definido en 20 pg /ml para la concentración de IFN- γ nos permitió distinguir entre el grupo de casos probados y el grupo de individuos no infectados con alta sensibilidad (70-92 %) y especificidad (85-95 %), para los cuatro antígenos probados. Los valores predictivos positivos del 82-95 % y negativos del 77-92 % también fueron muy altos, comparables a los reportados para IGRA disponibles comercialmente. La nueva prueba constituye un método de diagnóstico prometedor para detectar individuos con infección latente por *H. capsulatum*, incluso décadas después de la infección primaria, como se evidencia en este estudio.

3.2 Introducción

La HPM, causada por el patógeno fúngico primario *H. capsulatum*, es la micosis sistémica endémica más común en las Américas (Deepe, 2014) y es responsable de numerosas muertes en América Latina (Adenis et al., 2018). Las estimaciones de prevalencia muestran que un tercio de la población latinoamericana ha estado expuesta a este hongo. Sin embargo, la infección por *H. capsulatum* generalmente no es considerada y a menudo se diagnostica erróneamente como tuberculosis (Adenis et al., 2018).

Las personas inmunocomprometidas tienen un riesgo mayor de sufrir una infección diseminada por *H. capsulatum*. Además, otros factores como el uso de medicamentos inmunosupresores y terapias biológicas han contribuido a la alta carga de esta enfermedad (Adenis et al., 2014; Vergidis et al., 2015). Este fenómeno está asociado no solo a infecciones primarias en individuos inmunocomprometidos, sino también a la reactivación de focos latentes del hongo que dejan infecciones previas (Sifuentes-Osornio et al., 2012; Tsiodras et al., 2008; Wheat, 1995).

Históricamente, la prueba cutánea con histoplasmina, que mide la hipersensibilidad de tipo retardado a *H. capsulatum*, fue esencial para definir las áreas donde este hongo es endémico y para revelar la alta frecuencia insospechada de infección asintomática en esas áreas (Carmona, 1971; Scully y Baddley, 2018). Sin embargo, esta prueba tiene importantes inconvenientes prácticos y ya no se utiliza en la práctica clínica. Por otro lado, y a pesar de los desarrollos en curso, en la actualidad no existe una prueba de laboratorio capaz de detectar eficientemente las infecciones subclínicas o latentes por *H. capsulatum* que quedan después de varios años de la infección primaria, lo que ayudaría a prevenir un posible desarrollo de formas activas y graves de HPM.

Un método ideal para lograr detectar infecciones latentes por *H. capsulatum* es el ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA). Este tipo de prueba se basa en el hecho de que las personas infectadas con un microorganismo que estimula la inmunidad celular desarrollan células T efectoras o de memoria específicas. Cuando se re-estimulan *in vitro* con los mismos antígenos específicos, estos linfocitos liberan IFN- γ , que puede cuantificarse con un inmunoensayo (Whitworth et al., 2013).

La primera prueba IGRA descrita (QuantiFERON-TB) se desarrolló para detectar la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y se han lanza-

do varias versiones comerciales desde la primera aprobación por la FDA en el 2001 (Aagaard et al., 2004; Mazurek y Villarino, 2003; Pieterman et al., 2018). Además, se han desarrollado otras pruebas IGRA para diferentes infecciones. Estos incluyen Citomegalovirus (QuantiFERON-CMV - la única prueba IGRA no tuberculosa aprobada por la FDA, en 2017) (Giulieri y Manuel, 2011); *Leishmania* (Gidwani et al., 2011; Turgay et al., 2010) and cutaneous (N = 20; Virus de la hepatitis B (Dammermann et al., 2015); Virus de la varicela zoster (Smith et al., 2001); *Toxoplasma gondii* (Chapey et al., 2010); *Mycobacterium leprae* (Weir et al., 1994); y VIH (Hober et al., 2000). En este estudio exploramos por primera vez, la capacidad de una prueba IGRA para detectar la infección por *H. capsulatum* en individuos asintomáticos.

3.3 Métodos

3.3.1 Muestra de la población

Se incluyó una cohorte de 126 individuos en el estudio. Todos los participantes fueron reclutados en Medellín, Colombia, entre enero de 2014 y diciembre de 2017. El estudio se realizó en la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) en Medellín. Se seleccionaron personas que, debido a la naturaleza de su trabajo o actividades recreativas, podrían haber estado en riesgo de infección por *H. capsulatum* al menos durante algunos períodos de sus vidas, por ejemplo, técnicos de laboratorio clínico que manipulan cultivos de este hongo, trabajadores de granjas avícolas o espeleólogos, que están expuestos al guano de murciélagos, el cual se encuentra con frecuencia en cuevas. Algunos de los individuos fueron identificados a partir de las historias clínicas preservadas en la CIB, revelando el momento de aparición de la infección activa por *H. capsulatum* e incluyendo datos relacionados con esos eventos de infección, en particular, los resultados de las pruebas serológicas.

Las personas dispuestas a participar en el estudio fueron evaluadas primero por un médico. Después de recibir una descripción detallada del estudio, los voluntarios proporcionaron un consentimiento informado por escrito. Se realizó una entrevista estructurada para determinar si estas personas habían estado expuestas a factores de riesgo de infección por *H. capsulatum* y para recopilar datos demográficos. También fueron sometidos a una prueba de VIH. Los criterios generales de inclusión fueron: prueba de VIH negativa (detección de anticuerpos contra el antígeno P24 del VIH1/2) y edad entre 10 y 82 años. Los criterios de exclusión fueron: estar en embarazo y presentar condiciones inmunosupresoras. Todos los participantes fueron sometidos a

pruebas serológicas (detección de anticuerpos por inmunodifusión en gel de agar y fijación de complemento) y a radiografías de tórax.

Los individuos se distribuyeron en cinco grupos (ver tabla 3.1.) de acuerdo con los criterios específicos de laboratorio clínico, así como factores de riesgo de infección por *H. capsulatum*.

Tabla 3.1. Criterios utilizados para la asignación de los grupos

Tipo de evidencia	Grupo A1 Sin inf. por Hc	Grupo A2 Sin inf. por Hc + Mtb	Grupo B Probado Infección por Hc	Grupo B Probable Infección por Hc	Grupo B Posible Infección por Hc
Directa Cultivo/PCR/	(n = 12)	(n = 8)	(n = 13)	(n = 30)	(n = 63)
Hc antígeno	NA	NA	Si	NA	NA IDGA–banda
Indirecta (serológica) M IDGA–banda H	No-reactiva	No-reactiva	No-reactiva	Reactiva	No-reactiva
	FC–Hmin		≥ 1:8		
	FC–levadura	≤ 1:8	≥ 1:32	≥ 1:8	
Factor de riesgo de infección por Hc	No	No	Sí	Sí	Sí
Evidencia clínica de HPM pasada	No	No	Sí	No	No
Evidencia clínica actual de HPM	No	No	No	No	No
Evidencia de otras infecciones pasadas	No	Sí	No	No	No

Fuente: (Rubio-Carrasquilla, et al., 2019).

Grupo A2: Sin infección por *H. capsulatum* (Hc), pero con previa infección con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Grupo B-Probado: al menos una evidencia micológica directa o indirecta, acompañada por factores de riesgo de exposición a infección por *H. capsulatum*. Grupo B-probable: Títulos en FC a levadura <1:32, acompañado de factores de riesgo de exposición a in-

fección por *H.capsulatum*. Grupo B- Posible: IDGA y FC no reactivas, pero con exposición a factores de riesgo.

Abreviaturas: Hc – *H. capsulatum*; IDGA – inmunodifusión en gel de agar; FC – fijación de complemento; Hmin – histoplasmina.

El grupo A1 (no infectado) incluía individuos sin evidencia clínica ni factores de riesgo de infección por *H. capsulatum*. El grupo A2, definido con el propósito de evaluar la especificidad de la prueba IGRA (además del grupo A1), se estableció para incluir a individuos con las mismas características que los del grupo A1, pero, además, con registros clínicos que demuestran la aparición previa de una infección causada por *Toxoplasma gondii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* o *Mycobacterium tuberculosis*, según lo determinado por altos títulos de anticuerpos específicos (*T. gondii*), cultivo (*P. brasiliensis*, *C. neoformans*) o la prueba de tuberculina.

La asignación de individuos al grupo "B-infección por *H. capsulatum* comprobada" (abreviada en lo sucesivo como "B-probado") se basó en evidencias documentadas de síntomas compatibles con HPM y los resultados positivos de al menos una de las siguientes pruebas micológicas (documentadas en sus historias clínicas o realizados dentro del estudio actual), siguiendo los criterios EORTC (Pauw et al., 2008) y las pautas recientes descritas en la literatura (Wheat et al., 2016):

- i) aislamiento del hongo en cultivo a partir de una muestra obtenida del sitio afectado o de la sangre, ii) demostración microscópica directa o en biopsias del morfotipo verdaderamente distintivo de este hongo dimorfo (*H.capsulatum*), como la presencia característica de levaduras intracelulares en fagocitos de sangre periférica o en macrófagos de tejido,
- ii) idetección de anticuerpos específicos para *H. capsulatum* en suero, especialmente precipitina M en una prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), iv) PCR anidada en muestras clínicas, o v) presencia del antígeno de *H. capsulatum* en orina (en este caso, al menos uno de los criterios anteriores también tuvo que ser tenido en cuenta).

Las personas en los grupos "B-infección probable por *H. capsulatum*" (B-probable) y "B- infección posible por *H. capsulatum*" (B-posible) tienen en común su exposición a factores de riesgo de infección por *H. capsulatum* y pruebas serológicas negativas contra la histoplasmina. Los individuos en el grupo B-Probable mostraron, además, títulos bajos de anticuerpos contra extractos de levadura en pruebas de fijación del complemento (FC).

3.3.2 Pruebas serológicas

Se obtuvieron muestras de sangre de todos los participantes. Se extrajo suero para pruebas de IDGA y FC para detectar anticuerpos específicos contra *H. capsulatum*. La histoplasmina se usó para la prueba de IDGA como se describe en otra parte del documento (Azar y Hage, 2017b). Esta prueba se consideró positiva si se observaron las bandas M o H, o ambas (Wheat et al., 2016). Las pruebas de FC se realizaron como se describe en (Azar y Hage, 2017b), usando extractos de histoplasmina o levaduras enteras. Se usaron diferentes valores de título como punto de corte para la clasificación de grupos, como se especifica en la tabla 3.1).

3.3.3 Antígenos de *H. capsulatum* para IGRA

Se utilizaron cuatro cepas diferentes de *H. capsulatum* como fuentes de los extractos de antígeno analizados en este estudio: G184AR (ATCC 26.027) y cepas nativas CIB1.980, 46.079 y 48.395, aisladas en la CIB, Medellín, Colombia. La histoplasmina (Hmin) se preparó en el laboratorio a partir de cultivos de micelio de las cepas G184AR y CIB1980. Estos cultivos se realizaron en medio HAM F-12 líquido suplementado con glucosa (18,2 g / L), ácido glutámico (1 g / L), HEPES (6 g / L) y cisteína (84 mg / L) y se incubaron a 25 °C en un agitador orbital a 150 rpm durante un mes. Los antígenos secretados de la fase de levadura de *H. capsulatum* se obtuvieron a partir del sobrenadante de los cultivos de las cepas *H. capsulatum* 46.079 y 48.395, realizados en el mismo medio que la forma micelial, pero incubados durante una semana a 37 °C.

La morfología de las células del micelio y de las levaduras se monitorizaron mediante microscopía óptica. Se realizó control de una alícuota de los cultivos en los medios sólidos infusión de cerebro y corazón (BHI) suplementado con 5 % de sangre de carnero y sabouraud sin antibióticos, para verificar la posible contaminación de los mismos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de los cultivos en el medio HAM F-12, estos se inactivaron con timerosal a una dilución 1:10.000 durante siete días a 25 °C. Los sobrenadantes se separaron por centrifugación a 12.000 rpm, 18 °C durante 15 minutos, y posteriormente se filtraron en dos etapas secuenciales utilizando membranas con poro de 8µm y 0,45µm, respectivamente.

Las fracciones solubles se concentraron 20x mediante liofilización y luego se dializaron con una membrana de MWCO: 6-8 KD (tubo RC estándar

marca Spectra/ Por® 1) contra solución salina tamponada con fosfato (PBS), 0,01 M, pH 7,2 para ser almacenado a - 70 °C, y contra el tampón de citrato 0,025 M, pH 3,5, antes de la cromatografía de intercambio catiónico (solo para histoplasminas).

Se aplicaron fracciones solubles de los cultivos de micelio a una columna de carboximetil (CM) sepharose CL-6B (2.0 × 16cm) (Sigma-Aldrich, EEUU) previamente equilibrada con tampón de citrato. Los antígenos absorbidos se eluyeron a 1 ml / min con un gradiente creciente de NaCl 0,05 M; 0,5 M y 1 M en tampón de citrato, produciendo fracciones enriquecidas del antígeno M con el tampón NaCl 0,5 M. Las fracciones que contenían el antígeno M, según lo detectado por Western blot, fueron agrupadas (Zancopé-Oliveira et al., 1993). Los antígenos de secreción de las levaduras de

H. capsulatum no se pasaron por columna de cromatografía. La concentración de proteína se determinó usando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, EEUU).

3.3.4 Prueba IGRA

Cultivo de sangre estimulado con antígenos de H. capsulatum. Se recogieron aproximadamente 15 ml de sangre por individuo en tubos con heparina de sodio (BD Vacutainer®, EEUU). Se dispuso sangre total (500 μ l / pozo) en platos de cultivo celular de 24 pozos (CELLSTAR, Greiner Bio One International, Austria) dentro de las 4 h a su recolección y se estimuló con i) 10 μ g / ml de histoplasmina de las cepas CIB1980 y G184AR de *H. capsulatum*; o ii) 10 μ g / ml de antígenos secretados de la fase de levadura de *H. capsulatum*, cepas 46.079 y 48.395. Pozos no estimulados (producción inespecífica de IFN- γ) y estimulados con 20 μ g / ml del mitógeno selectivo de células T fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich, EEUU) Se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Los cultivos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 h. Al final del período de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis por ELISA.

Medición del IFN- γ liberado en el cultivo. La producción del IFN- γ se midió utilizando un estuche de ELISA disponible comercialmente (Duo-set R&D Systems, Minneapolis, EEUU) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La densidad óptica (OD) de las microplacas de ELISA se midió con un espectrofotómetro (Bio-Rad laboratories Inc., EEUU) a 450 nm. Se usó una curva estándar de 8 puntos con concentraciones conocidas de IFN- γ

(1.000-7,8 pg /mL) para determinar el nivel de IFN- γ producido en respuesta a los diferentes antígenos *H. capsulatum*. La interpolación en la curva estándar generada se realizó utilizando el paquete estadístico Prisma 5 (GraphPad Software, EEUU). Las mediciones de la citoquina se presentan como la cantidad de citocina producida después de la estimulación con una corrección que representa el nivel basal, medido en el cultivo de células no estimuladas del mismo individuo.

Análisis estadístico. Los datos se recolectaron en una hoja de cálculo de Microsoft Excel. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión 3.4.2 del programa R-project con los paquetes estadísticos caret, psych y multcomp. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se empleó para analizar la distribución empírica de los datos de IFN- γ . Ninguno de los conjuntos de datos mostró una distribución normal ($p \leq 1.1E-14$).

La prueba de Levene se utilizó para evaluar la homogeneidad de las varianzas entre los diferentes grupos, lo que demuestra que los datos no fueron homocedásticos ($p \leq 0,038$). En consecuencia, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Dunn se usaron para las comparaciones múltiples de medianas de la concentración del IFN- γ entre los grupos. Se aplicó una corrección de Benjamini-Hochberg para controlar el error tipo I y se calcularon los valores ajustados de p (q). La sensibilidad del ensayo se evaluó como el porcentaje de respuestas positivas en el grupo B-Probado, mientras que la especificidad se calculó como el porcentaje de respuestas negativas en los grupos de control A1 y A2, tomados en conjunto. El valor predictivo positivo (VPP) se calculó como la relación entre los positivos en el Grupo B-Probado y el número total de positivos en los grupos A1, A2 y B- Probado. El valor predictivo negativo (VPN) es la relación entre la suma de negativos de los grupos A1 y A2, y el número total de negativos de los grupos A1, A2 y B-Proven. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas si el valor de p-ajustado (q) $< 0,05$.

Declaración de ética. Todos los procedimientos realizados en el estudio y el documento de consentimiento informado fueron aprobados por el comité de ética de la CIB. El estudio también fue aprobado por el comité de ética de las entidades promotoras de salud de Medellín que ayudaron a contactar a algunas de las personas que participaron en el estudio.

3.4 Resultados

3.4.1 Características de la población de estudio

Se evaluaron 126 individuos asintomáticos (64 mujeres y 62 hombres) que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para el estudio. La tabla 3.1. muestra el número de individuos asignados a cada grupo. Para el grupo A2, solo pudimos inscribir personas con registros previos de tuberculosis.

Título serológico al momento de ingresar en el estudio. Para el grupo A1, por definición, todas las pruebas serológicas fueron negativas. En el grupo A2, cuyos miembros tuvieron antecedentes de tuberculosis, ningún individuo reaccionó a las pruebas de IDGA y solo una persona mostró una reacción muy débil (título 1:8) en la prueba de FC contra la levadura. En el Grupo B-Probado, solo unos pocos individuos (5 / 13) presentaron una reacción positiva en la prueba de inmunodifusión, todos ellos al antígeno M, mientras que las pruebas de FC con histoplasmina arrojaron resultados positivos para siete personas (con títulos de 1:8). Cuando se realizó con extractos de levadura, las pruebas de FC arrojaron reacciones positivas solo para seis individuos, con diferentes títulos: 1:8 - 2 / 6, 1:16 - 1 / 6 y 1:64 - 3 / 6 individuos.

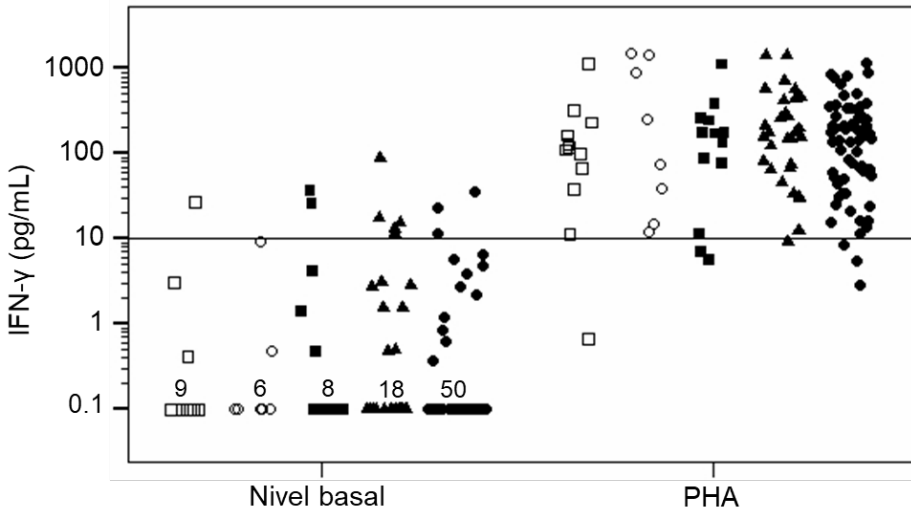
Los miembros del grupo B-Probable no mostraron reactividad en las pruebas de IDGA, pero sí la mostraron a los extractos de levadura en la prueba de FC. La mayoría de estos individuos presentaron títulos de anticuerpos entre 1:8 y 1:64 (90 %), mientras que solo el 10 % mostró títulos superiores a 1:64. Solo un individuo de este grupo reaccionó a la histoplasmina. Por otro lado, todos los individuos del grupo B-Posible, se caracterizaron por la ausencia de reactividad serológica (la asignación a este grupo se basó única y exclusivamente por la presencia de factores de riesgo).

3.4.2 Producción de IFN- γ en respuesta a diferentes antígenos de *H. capsulatum*

Los cultivos de la sangre total se estimularon con cuatro crudos de antígenos de *H.capsulatum*: dos histoplasminas y dos extractos de levadura, obtenidos de diferentes cepas de *H. capsulatum*, así como con la PHA, que sirve de control positivo para validar la inmunocompetencia. Los niveles basales de IFN- γ , obtenidos en ausencia de cualquier estimulación, mostraron un valor medio de 0,4 pg / ml. Solo seis individuos presentaron niveles basales superiores a 20 pg / mL (ver abajo la definición del punto de corte) y un miembro del grupo B-Probable alcanzó 87 pg / mL. En todos los individuos,

la PHA aumentó sus niveles de IFN γ en sangre (valor medio = 302 pg / ml), que abarcó un amplio rango de valores de concentración y mostró un comportamiento similar para los cinco grupos (figura 3.1.).

Figura 3.1. Niveles de IFN- γ basal y después de la estimulación con el mitógeno de linfocitos T (PHA), para los cinco grupos de individuos evaluados



Nota. El eje vertical del grafico está en escala logarítmica. Los símbolos \square , \circ , \blacksquare , \blacktriangle , \bullet representan a los individuos de los grupos

Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

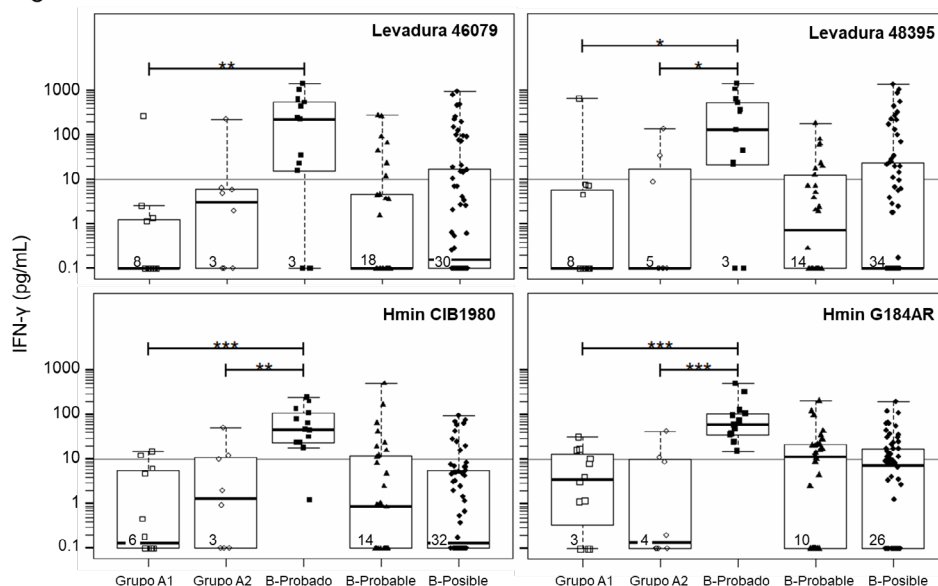
A1, A2, B probado, B probable y B posible respectivamente. Para el nivel basal, a los individuos con la concentración de IFN- γ por debajo de 0,1 pg / ml, se les asignó un valor igual a 0,1 pg / ml para que encajaran en el gráfico. La identidad de cada individuo con las concentraciones entre 0 y 0,1 pg / mL de IFN- γ fueron 6, 8, 9, 18 y 51. La barra horizontal en 10 pg / mL fue incluida para distinguir visualmente entre los niveles bajos y medio-altos de IFN- γ .

La figura 3.2. muestra las respuestas de IFN- γ por grupo para cada uno de los cuatro antígenos seleccionados, así como los resultados de los análisis estadísticos. Aquí, los niveles específicos de IFN- γ obtenidos después del estímulo con cada antígeno de *H. capsulatum* para un individuo dado se ajustaron restando el respectivo nivel basal de esta citoquina. En el grupo B-Probado, la respuesta a las histoplasminas y extractos de levadura fueron superiores a 20 pg / ml en la mayoría de los casos. Los dos extractos de levadura arrojaron las respuestas de IFN- γ más altas medidas ({mediana, [IC 95 %]}):

{223, [15-547]} pg / ml para la cepa 46079; {133, [21-530]} pg / ml para la cepa 48395) en comparación con la obtenida para las dos histoplasminas ({47 [24-111]} pg / mL para la cepa CIB1980 y {60, [36-107]} pg / mL para la cepa G184AR), aunque con una variabilidad mayor, como se refleja en sus rangos mucho más amplios de intervalos de confianza.

Figura 3.2. Producción de IFN- γ por cada grupo de individuos después del estímulo con los diferentes extractos de levaduras e histoplasminas

Figura 3.2.



Nota. El eje vertical del grafico está en escala logarítmica. Los símbolos \square , \circ , \blacksquare , \blacktriangle , \bullet representan a los individuos de los grupos A1, A2, B probado, B probable y B posible, respectivamente. A los individuos con la concentración de IFN- γ por debajo de 0,1 pg / ml, se les asignó un valor igual a 0,1 pg / ml para que encajaran en el gráfico. En la parte de abajo de cada diagrama, está indicado el número de individuos dentro de este rango. En la barra superior del diagrama está indicado las diferencias estadísticas significativas entre cada par de grupos. * $q < 0,05$; ** $q < 0,01$ y *** $q < 0,001$ ("q" representa valores de p ajustado).

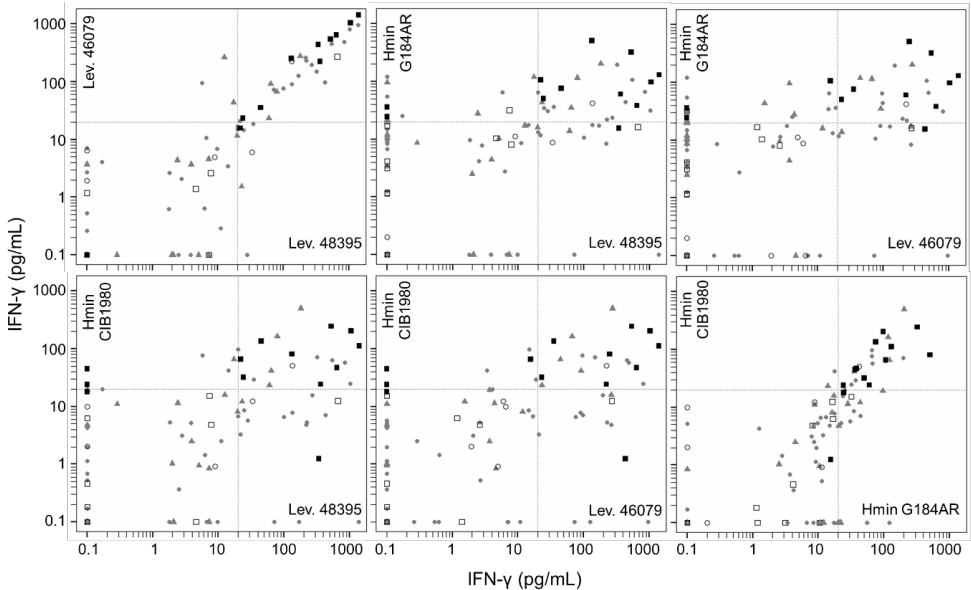
Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

En los grupos A1 y A2 con individuos sin registro de exposición a factores de riesgo de infección por *H. capsulatum*, las respuestas de IFN- γ a los cuatro antígenos de *H. capsulatum* se encontraron principalmente en rangos bajos, con medianas y una dispersión relativamente baja. Para los grupos B-Probable y B-Posible, las respuestas a todos los antígenos mostraron una alta variabilidad, con medianas dentro de los niveles bajos de respuesta.

3.4.3 Definición del punto de corte de la respuesta de IFN- γ

A pesar de las diferencias estadísticamente significativas obtenidas entre los grupos B-Probado y no infectados con *H. capsulatum* (A1 y A2), la superposición de sus rangos de concentración de IFN- γ no produce un valor de corte obvio para discriminar entre las respuestas de IFN- γ positivas y negativas hacia los antígenos de *H. capsulatum*. Con el objetivo de facilitar este análisis, elaboramos gráficos de dispersión para las seis posibles combinaciones por pares de las cuatro preparaciones de antígeno seleccionadas, como se muestra en la figura 3.3. Las líneas punteadas horizontales y verticales en estos gráficos, colocadas simétricamente al mismo nivel de IFN- γ en ambos ejes, divide las mediciones en cuadrantes. Establecer el nivel de estas líneas en 20 pg / ml separa a la mayoría de los casos probados de HPM en el cuadrante superior derecho, mientras que la mayoría de los controles negativos (grupos A1 y A2) permanecen en el cuadrante inferior izquierdo.

Figura 3.3. Producción de IFN- γ por individuos de los diferentes grupos por combinaciones de dos de los cuatro antígenos seleccionados de *H. capsulatum*



Nota. Ambos ejes están en escala logarítmica. Las líneas punteadas horizontal y vertical de cada gráfico, fueron ubicadas en el punto de corte de 20 pg / ml de IFN- γ que separa los grupos en cuadrantes. Los símbolos \square , \circ , \blacksquare , \blacktriangle , \bullet representan a los individuos de los grupos A1, A2, B probado, B probable y B posible, respectivamente.

Fuente: (Rubio-Carrasquilla, Santa, et al., 2019).

La figura 3.3. también muestra, para el grupo B-Probado, una marcada correlación dentro del cuadrante superior derecho entre las respuestas de IFN- γ a los dos filtrados de levadura ($R=0,96$), así como entre las respuestas a las dos histoplasminas ($R=0,91$). Correlaciones similares son evidentes también para los Grupos B-Probable y B-Posible (no calculado). Por el contrario, no existe una correlación aparente para ninguna de las combinaciones de levadura / micelio.

Utilizando la concentración de IFN- γ elegida de 20 pg / ml como valor de corte para clasificar la respuesta, calculamos la sensibilidad, especificidad y poder discriminante (positivo y negativo) de nuestro ensayo para cada una de las cuatro preparaciones de antígeno de *H. capsulatum*. Como se enumera en la tabla 3.2, todos los antígenos arrojaron valores altos para todos los parámetros calculados, con las dos histoplasminas mostrando un mejor rendimiento. En los grupos B- Probable y B-Posible, 40 % y 36 % de los individuos, respectivamente, mostraron respuestas positivas a al menos uno de los antígenos *H.capsulatum*.

Tabla 3.2 Poder de discriminación de la prueba IGRA

<i>Antígeno de Hc</i>	<i>Sensibilidad (%)</i>	<i>Especificidad (%)</i>	<i>Valor Predictivo Positivo (%)</i>	<i>Valor Predictivo Negativo (%)</i>
Hmin-G184AR	92	90	95	86
Hmin-CIB1980	85	95	91	92
Levadura-46079	70	90	82	82
Levadura-48395	77	85	85	77

Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

3.4.4 IGRA versus pruebas serológicas

Comparamos los resultados de las pruebas serológicas realizadas en este estudio con la respuesta obtenida en IGRA a los antígenos analizados, para todos los miembros del grupo B- Probado (tabla 3.3.). Los 13 individuos mostraron al menos una respuesta positiva en la prueba IGRA, ocho de ellos respondieron a los cuatro antígenos *H. capsulatum*. Siete individuos de este grupo habían sido infectados con *H. capsulatum* varios años (5.5-36 años) antes del comienzo de este estudio. Dentro de este subgrupo, una proporción menor presentó resultados positivos a las diferentes pruebas serológicas, como se muestra en la tabla 3.3. En contraste, los siete individuos mostraron

respuestas positivas para al menos dos antígenos en la prueba IGRA, con 4 / 7 (57 %) reaccionando a los cuatro antígenos. Un segundo subgrupo del Grupo B-Probado, compuesto por seis individuos que se infectaron un año antes del estudio, mostró mejores reactividades en las pruebas serológicas que el subgrupo “antiguo”.

Tabla 3.3 IGRA versus pruebas serológicas en el grupo B-Probado

Número de individuos	Tiempo post infección ^a	Serologías ^b				IGRA	
		IDGA	FC-Hmin	FC-Levadura	Hmin ^c	Levadura D	Hmin+Levadura ^e
6	< 1 año	3 (50 %)	4 (67 %)	4 (67 %)	6 (100%)	4 (67 %)	4 (67 %)
7	5.5-36 años	2 (29 %)	3 (43 %)	2 (29 %)	6 (86 %)	6 (86 %)	5 (71 %)

Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

- a) Tiempo transcurrido entre el informe de la infección por *H. capsulatum* y las pruebas realizadas en este estudio; b) individuos con respuestas positivas a las diferentes pruebas serológicas realizadas en este estudio; c) respuestas positivas para al menos uno de los antígenos de histoplasmina; d) respuestas positivas para al menos uno de los antígenos de levadura; e) respuestas positivas para al menos una de las histoplasminas y uno de los antígenos de levadura. *Abreviaturas:* ver notas al pie de la tabla 3.1.

3.5 Discusión

En la actualidad, los médicos carecen de una prueba de laboratorio capaz de detectar infecciones subclínicas o latentes por *H. capsulatum*. Aquí evaluamos, hasta donde sabemos por primera vez, el desempeño de una prueba IGRA para detectar en sangre periférica la presencia de linfocitos T específicos para antígenos de *H. capsulatum*, como evidencia de una infección latente en individuos asintomáticos.

Decidimos probar dos tipos de preparaciones crudas de antígenos de *H. capsulatum*: i) filtrado de cultivo de micelio (histoplasmina); y ii) filtrado de cultivo de levadura (Allan Jefferson Guimarães et al., 2004). Aunque estos crudos provienen de dos morfotipos fúngicos diferentes, contienen antígenos comunes (Guimarães et al., 2008), en particular las glicoproteínas M y H

(Deepe y Durose, 1995; Johnson et al., 2002), caracterizadas por su capacidad para estimular tanto una respuesta inmune mediada por anticuerpos como por linfocitos T (Harris y Deepe, 1988). Vale la pena señalar que tres de estas preparaciones de antígenos se obtuvieron de tres cepas diferentes de *H. capsulatum* autóctonas de Colombia.

Se demostró que tanto la histoplasmina como los extractos de levadura inducen respuestas altamente específicas de IFN- γ , lo que permite diferenciar entre la mayoría de los casos probados de HPM (grupo B-Probado) y la mayoría de los individuos no expuestos al hongo (grupos A1 y A2). En general, las concentraciones de IFN- γ obtenidas por estimulación con los filtrados de levadura fueron mayores que las inducidas por las histoplasminas, pero, por otro lado, las respuestas a los antígenos de micelio fueron más homogéneas, mostrando una dispersión más baja. En todos los casos, las diferencias entre el grupo B-Probado y los grupos de control negativo A1 y A2 fueron estadísticamente significativas.

El valor de corte de concentración de IFN- γ de 20 pg / ml permitió discriminar entre grupos de control positivo y negativo con alta sensibilidad y especificidad, que oscilaron entre 70-92 % y 85-95 %, respectivamente, según lo evaluado individualmente para cada uno de los cuatro antígenos. Los crudos de histoplasmina mostraron una mejor sensibilidad que los filtrados de levadura (85-92 % versus 70-77 %), mientras que las especificidades fueron similares. Los valores predictivos positivo y negativo también fueron muy altos: 82-95 % y 77-92 %, respectivamente. Todos estos valores son comparables a los reportados para los IGRA disponibles comercialmente (Giulieri y Manuel, 2011; Rutledge et al., 2010).

3.5.1 IGRA versus pruebas serológicas

Alrededor del 37 % de los individuos de los grupos B-Probable y B-Posible mostraron respuestas positivas de IFN- γ para al menos uno de los antígenos de *H. capsulatum*, y por lo tanto podrían clasificarse como infectados. En este punto, vale la pena recordar que los individuos en el grupo B-Posible no mostraron títulos de anticuerpos ni por inmunodifusión ni en el ensayo de fijación del complemento, por lo que se clasificarían como negativos de acuerdo con estas pruebas serológicas. Por lo tanto, la prueba IGRA puede revelar una infección latente en estos individuos, que no se puede detectar con las pruebas serológicas estándar. Curiosamente, la proporción de individuos con IGRA positivo en los grupos B-Probable y B-Posible es algo

mayor, pero comparable con los números publicados por (Carmona FJ, 1971), quien describe una prevalencia de infección subclínica por *H. capsulatum* en Medellín de alrededor de 25 %, según lo detectado por la prueba cutánea realizada con histoplasmina.

En este estudio observamos una clara tendencia de que la respuesta serológica se desvanece con el tiempo, resultados que están de acuerdo con publicaciones anteriores que describen la desaparición de anticuerpos específicos de *H. capsulatum* en individuos que resolvieron una HPM activa y permanecen "sanos" a lo largo de los años (Aidé, 2009; Fernandez-Andreu et al., 1994; Nel et al., 2018). Por lo tanto, es sorprendente observar la larga persistencia de una respuesta inmune humoral en algunas personas, que mostraron títulos detectables de anticuerpos anti-*H. capsulatum* hasta 23 años después de la infección. Tal persistencia podría deberse a la presencia de focos latentes del hongo (Sifuentes-Osornio et al., 2012), aunque no podemos descartar que algunos de estos individuos pudieran haber estado en contacto con el hongo en ocasiones más recientes, lo que puede haber estimulado su sistema inmunológico sin causar una recurrencia de la enfermedad.

En contraste, en la prueba IGRA, se detectaron respuestas inmunes celulares en todos los individuos del Grupo B-Probado, independientemente del tiempo transcurrido desde la infección primaria, lo que indica que la memoria inmune celular contra *H. capsulatum* persiste mucho más que la memoria humoral, aunque faltarían más datos para soportar esta hipótesis. Una explicación plausible a esta observación proviene del hecho de que este hongo es un patógeno intracelular y, por lo tanto, activa el procesamiento de antígenos y la presentación en las moléculas de MHC de clase II por los fagocitos (Cain y Deepe, 2000; Holbrook y Rappleye, 2008) lo que podría producir una reestimulación recurrente de la memoria celular específica para *H. capsulatum* preexistente.

3.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio exploratorio son muy prometedores, puesto que allanan el camino para poder alcanzar el desarrollo de una prueba IGRA estandarizada capaz de detectar infecciones subclínicas o latentes ocasionadas por *H. capsulatum* en individuos asintomáticos, incluso después de muchos años de la aparición de la infección primaria. Se necesitan más estudios para validar e introducir esta prueba IGRA en la práctica clínica, incluidas cohortes más grandes de individuos y diferentes

preparaciones de antígeno. Este tipo de prueba diagnóstica sería de gran ayuda en estudios epidemiológicos destinados a evaluar la magnitud real de la infección por *H. capsulatum* en poblaciones en riesgo, como es el caso en muchas regiones de Colombia.

Hacia una prueba HistoFerón con antígenos molecularmente definidos: una primera aproximación desde la bioinformática

4.1 Introducción

En el capítulo anterior se demostró la viabilidad de una prueba de tipo IGRA, que fue llamado HistoFerón, para detectar infecciones subclínicas o latentes producidas por el hongo patógeno *H. capsulatum*, con alta sensibilidad y especificidad. En esta prueba utilizamos preparados antigénicos crudos, obtenidos a partir de filtrados de los sobrenadantes de cultivos del hongo, tanto en su forma micelial como de levadura. También ensayamos dos antígenos de *H. capsulatum* en forma de proteínas recombinantes – la precipitina M y la proteína de estrés térmico Hsp60.

En este capítulo, utilizando metodologías y herramientas bioinformáticas, exploramos posibles opciones de desarrollo de una nueva generación de la prueba HistoFerón, basada en antígenos molecularmente definidos, en particular, en proteínas recombinantes o mezclas de péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias de proteínas seleccionadas de *H. capsulatum*.

Con el objetivo de ubicar en contexto nuestro trabajo bioinformático, se analizó inicialmente las distintas estrategias que han sido empleadas, en la selección y diseño de los antígenos utilizados en las pruebas IGRA en otros modelos infecciosos, comenzando por los ensayos comercialmente disponibles para *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

4.1.1 Diseños de péptidos en los ensayos IGRA para *Mtb*

En las pruebas de tipo IGRA que han sido informadas en la literatura científica, se observa una evolución en la naturaleza y estructura molecular de los antígenos utilizados, que va desde el uso de preparados crudos hacia la identificación de proteínas únicas en el microorganismo de interés, y el uso de mezclas de péptidos derivados de estas proteínas. Esta evolución ocurrió

desde muy temprano en el desarrollo de la prueba comercial QuantiFERON-TB, para la detección de infección por *Mtb*.

Así, en la primera versión del Quantiferon, se empleó como antígeno el mismo derivado proteico purificado (PPD) utilizado en el tradicional ensayo TST (*tuberculosis skin test*). Debido a la baja especificidad obtenida (Mazurek y Villarino, 2003), se desarrolló una nueva versión (QuantiFERON-TB Gold) que utiliza una mezcla de péptidos sintéticos derivados de dos proteínas de *Mtb*, ESAT-6 y CFP-10, los cuales estimulan linfocitos T-CD4+ específicos (Aagaard et al., 2004).

Es importante destacar que los péptidos sintéticos de ESAT-6 y CFP-10 cubren de manera exhaustiva toda la secuencia de estas dos proteínas (que son muy cortas: de 95 y 100 aa, respectivamente), teniendo cada uno una longitud de 15 aa y un solapamiento de 9 aa, tanto con su péptido antecesor como con el sucesor en la secuencia (Arend et al., 2000; Nagai et al., 2014). Nueve aminoácidos es precisamente el tamaño característico del núcleo peptídico que puede ubicarse en el surco de unión de la molécula HLA de clase II, mientras que el resto de los aminoácidos ubicados en cualquiera de los dos extremos del péptido (N- o C-terminal) se “desbordan” por fuera del surco (Brown et al., 1993).

Con este diseño de los péptidos para el ensayo QuantiFERON- TB Gold (el cual se ha mantenido en las versiones siguientes) se garantiza la presentación sobre HLA de todos los posibles epítopes T de clase II, contenidos en las dos proteínas escogidas, que son compatibles con el haplotipo del individuo ensayado. En otras palabras, los autores emplearon un enfoque de “fuerza bruta” para cubrir todos los posibles péptidos antigénicos.

La versión más reciente, QuantiFERON-TB Plus, mantiene un primer tubo de ensayo (TB1) con el mismo diseño de péptidos de las versiones anteriores, pero agrega un segundo tubo (TB2) con péptidos más cortos, diseñados para estimular la producción de IFN- γ tanto por linfocitos T CD4+ como CD8+ (Barcellini et al., 2016)2]. The diagnostic tools for latent tuberculosis infection (LTBI). Las secuencias de aminoácidos de estos péptidos no fueron reveladas, pero en un artículo reciente encontramos algunas claves sobre el probable diseño utilizado:

Losi y colaboradores (Losi et al., 2016) añadieron un coctel de seis péptidos al tubo del ensayo QuantiFERON-TB Gold-In-Tube, derivados de cuatro proteínas de *Mtb* (Rv0724A, Rv1251c, Rv1478 y Rv3479), que se sobre-

expresan en un modelo *in vitro* de infección de macrófagos. Los péptidos fueron diseñados para unirse de manera promiscua a múltiples alelos de HLA de clase II, y aunque el diseño estuvo enfocado en la estimulación de linfocitos T CD4+, estos nuevos péptidos contienen también epítopes T de clase I, que estimulan adicionalmente respuestas T CD8+ (Losi et al., 2016).

En un segundo tipo de ensayo IGRA disponible comercialmente para *Mtb*, T-Spot-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido), basado en la técnica de ELISPOT, también se utilizan péptidos de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 como antígenos, de 15 aa de longitud y 10 aa de solapamiento entre ellos, que cubren por completo ambas secuencias (17 péptidos de ESAT-6 y 18 de CFP-10) (Lalvani, 2007)the enzyme-linked immunospot (ELISpot. Además de estimular la producción de IFN- γ por linfocitos efectores T CD4+, también se obtienen respuestas de linfocitos T CD8+ (Lalvani, 2007)the enzyme-linked immunospot (ELISpot).

4.1.2 Antígenos molecularmente definidos en otros modelos de IGRA

Como se describe en el Capítulo II de este documento, las pruebas de tipo IGRA se han ensayado en diferentes modelos infecciosos, utilizando diferentes tipos de antígenos. Así, se han empleado preparados antigénicos crudos en *Citomegalovirus* (Abate et al., 2014): partículas completas del virus, usadas en ensayos ELISPOT; para *Leishmania* (Gidwani et al., 2011): CSA (*crude soluble antigen*) y SLA (*soluble Leishmania antigen*); en el virus varicella-zoster (Smith et al., 2001)with the ability to detect gamma interferon spot-forming cells (SFC: antígenos del virus secretados al sobrenadante del cultivo por células MRC-5 infectadas; *Toxoplasma gondii* (Chapey et al., 2010): antígeno crudo y proteínas de la pared.

Se han utilizado también proteínas purificadas o recombinantes, en pruebas tipo IGRA ensayadas en *Leishmania* (Turgay et al., 2010): proteína Histona B2 (H2B); *Mycobacterium leprae* (Weir et al., 1994): antígenos purificados de 18, 65 y 70 kDa; Virus 1 de inmunodeficiencia humana (Hober et al., 2000): proteína p24 (secretada al sobrenadante del cultivo por células T CD4+ humanas infectadas), proteínas recombinantes p24 y gp120.

En un enfoque más refinado desde el punto de vista molecular, se han utilizado péptidos como antígenos en diferentes ensayos IGRA, aplicados a varios modelos infecciosos, entre los cuales vale destacar (además de las pruebas Quantiferon para *Mtb*) la prueba QuantiFERON- CMV para *Citomegalovirus*. En este ensayo se utiliza una mezcla de 22 péptidos diseñados

para unirse a un amplio panel de alelos de HLA de clase I y estimular linfocitos T CD8+. La mayoría de estos péptidos (14 de ellos) fueron derivados de la proteína pp65, mientras que los ocho restantes provienen de otras cinco proteínas virales.

Otro modelo infeccioso donde se han empleado mezclas de péptidos para evaluar la producción de IFN- γ es con *Leishmania*. Turgay y colaboradores (Turgay et al., 2010) and cutaneous (N = 20 utilizaron dos mezclas, compuesta cada una por 10 péptidos de 22-28 aa cada uno. Una de las mezclas cubría toda la secuencia de la proteína H2B, mientras que la otra consistía en potenciales epítopes T de clase II de la proteína PSA-2, predichos computacionalmente (Turgay et al., 2010) and cutaneous (N = 20. En otro estudio (Gidwani et al., 2011) se utilizaron mezclas de péptidos de las proteínas H2B, PSA2 y Lepp12, además de dos crudos antigénicos, como se describió antes. Los autores no revelaron la composición de las mezclas de péptidos. Por otro lado, estos péptidos no produjeron resultados satisfactorios, mientras que uno de los crudos utilizados (SLA) mostró resultados significativos en cuanto a sensibilidad y especificidad.

En una prueba IGRA para el virus de la hepatitis B (HBV) (Dammermann et al., 2015) se emplearon mezclas de péptidos de los antígenos HBcAg (*hepatitis B core antigen*) y HBsAg (*hepatitis B surface antigen*). La mezcla representativa de la proteína HBcAg consistía en 44 péptidos de 15 aa de longitud y un solapamiento entre ellos de 11 aa, que cubrían toda la secuencia de la proteína. La mezcla para HBsAg estaba constituida por 98 péptidos, con el mismo diseño de 15/11 aa, cubriendo igualmente toda la secuencia.

En contraste con el enfoque de fuerza bruta empleado en el ejemplo anterior, Hober y colaboradores (Hober et al., 2000), en un estudio realizado con un reducido número de individuos en el modelo del virus 1 de inmunodeficiencia humana (HIV-1), ensayaron individualmente un total de 9 péptidos: tres péptidos derivados de la secuencia de la glicoproteína gp120 (de longitudes 12, 13 y 17 aa), otro de gp41 (18 aa) y cinco péptidos de la proteína p24 (10-18 aa). También ensayaron los antígenos gp120 y p24 completos, en forma de proteínas recombinantes. Solo con tres de los péptidos utilizados, las respuestas de IFN- γ fueron similares a las obtenidas con los antígenos recombinantes. Los autores no informaron sobre las restricciones por tipo de HLA de los péptidos ensayados, ni caracterizaron los haplotipos de los individuos enrolados en el estudio, por lo que no es posible evaluar la influencia de este factor en las respuestas negativas a los restantes péptidos.

En *Toxoplasma gondii*, Cong y colaboradores (Cong, et al., 2011) evaluaron un total de 29 péptidos restringidos a la familia de alelos HLA-A*02 (epítopes T de clase I). Dichos péptidos provenían de 11 proteínas diferentes, y fueron seleccionados por su alta afinidad de unión ($IC_{50} < 50nM$) según predicciones computacionales. Diez de estos péptidos estimularon de manera significativa la producción de IFN- γ en individuos portadores del alelo HLA-A*0201 e infectados con *T. gondii* (Cong et al., 2011).

En otro trabajo reciente, también en *T. gondii*, (Cardona et al., 2015) utilizaron igualmente un enfoque computacional para identificar péptidos restringidos por el haplotipo HLA- A*02, capaces de inducir respuestas de IFN- γ en individuos infectados con el parásito. Partieron de secuencias de proteínas que habían sido identificadas previamente como estimuladoras de IFN- γ , y seleccionaron 9 péptidos derivados de 9 proteínas diferentes de *T. gondii* (o sea, un péptido por cada proteína). De ellos, cuatro péptidos produjeron niveles altos de IFN- γ en ensayos Elispot (Cardona et al., 2015).

4.1.3 Diseño de péptidos para un ensayo IGRA: ¿de clase I, o II?

El estudio de diferentes casos que hemos realizado, sintetizado en el epígrafe anterior, evidencia el uso de péptidos tanto de clase I como de clase II, diseñados para estimular linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente. Las pruebas IGRA que han llegado al mercado, para *Mycobacterium tuberculosis* y *Citomegalovirus*, representan ambos enfoques. Así, las versiones más recientes del Quantiferon-TB, y también el ensayo T-SPOT.TB, se basan en péptidos que estimulan fundamentalmente respuestas de IFN- γ por linfocitos T CD4+, aunque algunos de estos péptidos tienen también la capacidad de estimular respuestas T CD8+. Los péptidos de la prueba Quantiferon-CMV para citomegalovirus, en cambio, por la naturaleza de este agente infeccioso y la respuesta inmune del hospedero frente a él, fueron diseñados para un conjunto de alelos de HLA de clase I, o sea, para estimular respuestas T CD8+ (Giulieri y Manuel, 2011).

Resulta interesante notar que en los diseños de péptidos dirigidos a linfocitos T CD4+, predomina un enfoque de fuerza bruta, barriendo toda la secuencia de las proteínas seleccionadas como antígenos específicos, con péptidos solapantes de una longitud apropiada para presentación sobre HLA de clase II. En contraste, para los péptidos dirigidos a estimular linfocitos T CD8+ se ha seguido generalmente un enfoque de diseño racional, a partir de predicciones computacionales.

Uno de los factores que muy probablemente ha influido en la elección de uno u otro enfoque es el nivel de precisión de las predicciones de epítopes T, que se diferencia sustancialmente entre las dos clases de HLA. Mientras que los algoritmos de predicción de epítopes T de clase I (presentación sobre HLA-A, B y C) han alcanzado un alto grado de confiabilidad en la identificación de péptidos con capacidad de unión al surco de HLA (Nielsen y Andreatta, 2016), la predicción de epítopes T de clase II (presentación sobre HLA-DR, DP y DQ) no alcanza todavía un nivel satisfactorio (Chaves et al., 2012).

Otro factor importante para tener en cuenta es el papel que desempeñan las células T CD4+ y CD8+ en la respuesta inmune a un patógeno determinado, y en correspondencia, cuáles de estos dos tipos de células sería más conveniente estimular para obtener una mayor producción de IFN- γ . Para *H. capsulatum*, se necesita una respuesta de tipo Th1 para la activación de los macrófagos y el aclaramiento eficiente de la levadura (Horwath, Fecher y Deepe, 2015). En esta respuesta, las células T CD4 + son cruciales, siendo ellas las principales productoras de IFN- γ (Allendoerfer y Deepe, 1997). Las células T CD8+ también desempeñan un papel en la defensa del hospedero frente a la HPM, pero con consecuencias menores en comparación con las células T CD4+, en un hospedero inmunocompetente (Horwath et al., 2015).

4.2 Métodos

Se exploraron en paralelo dos estrategias alternativas para identificar posibles antígenos a utilizar en una nueva versión de la prueba HistoFerón: i) Identificación de epítopes únicos en proteínas de *H. capsulatum* que ya han sido caracterizadas como moléculas inmunogénicas en la literatura científica; y ii) Identificación de proteínas específicas de *H. capsulatum*, o sea, proteínas que no tienen ortólogos cercanos en otros hongos relacionados. Estas proteínas podrían utilizarse en la prueba IGRA en forma de proteínas completas o como fuentes de péptidos inmunogénicos y específicos.

4.2.1 Identificación de proteínas específicas de *H. capsulatum*

Utilizamos las secuencias de todas las proteínas identificadas en las cuatro cepas de *H. capsulatum* cuyos genomas han sido secuenciados: G186AR – 9.315 proteínas; H88 y H143 – 9.449 y 9.582 proteínas, respectivamente; y NAM1 – 18.736 proteínas. Las secuencias de *H.capsulatum* fueron comparadas con las secuencias de proteínas de cuatro especies de hongos filogenéticamente cercanos: *Blastomyces dermatitidis* (11.211), *Emmonsia parva* (8.562),

Paracoccidioides brasiliensis (16.834) y *Paracoccidioides lutzii* (18.015). La identificación de grupos de proteínas ortólogas en estos proteomas fue realizada con el programa OrthoMCL.

Las proteínas de *H. capsulatum* seleccionadas por su especificidad fueron analizadas con los programas TMHMM (Krogh et al., 2001) para predecir dominios transmembrana; SignalP 3.0 y SecretomeP (Bendtsen et al., 2004) para predecir péptidos señal y proteínas de secreción, respectivamente; y TargetP (Emanuelsson et al., 2000) para predecir proteínas mitocondriales.

4.2.2 Comparación de secuencias de proteínas

Utilizamos el servidor BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar las secuencias de las proteínas seleccionadas de *H. capsulatum* contra la base de datos de secuencias no redundantes del NCBI. Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa Clustal X (Larkin et al., 2007).

4.2.3 Predicción de epítopes T de clase I y II

La predicción de los epítopes T de clase I fue realizada con el servidor NetMHC 4.0 (Nielsen y Andreatta, 2016). Para los epítopes T de clase II utilizamos el servidor NetMHCII 2.3 (Jensen et al., 2018).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Selección de proteínas inmunogénicas de *H. capsulatum*

Seleccionamos siete proteínas de *H. capsulatum* con propiedades inmunogénicas demostradas experimentalmente (tabla 4.1), para ser analizadas como posibles antígenos en una futura versión de la prueba HistoFerón, en particular como fuentes de péptidos específicos e inmunogénicos. Estas macromoléculas han sido evaluadas en múltiples estudios, con el objetivo de establecer su papel en la patogénesis y en la respuesta inmune contra este hongo. Algunos de estos antígenos son parte de la membrana y la pared celular de la fase de levadura y otros son secretados al ambiente extracelular a través de transporte vesicular clásico y no clásico (Nosanchuk et al., 2012). Los dos primeros antígenos incluidos en la lista fueron precisamente los que utilizamos como proteínas recombinantes en la prueba HistoFerón: el antígeno M y la proteína de estrés térmico Hsp60.

1. El antígeno M es una catalasa extracelular (Catalasa B) involucrada en la desintoxicación de los componentes reactivos del oxígeno producidos durante la respiración celular. Es un antígeno inmunodominante, no solo por estimular anticuerpos específicos durante todas las fases de la infección, sino también por desencadenar una respuesta inmune mediada por linfocitos T (Harris y Deepe, 1988; R. M. Zancopé-Oliveira et al., 1999b).
2. La proteína Hsp60, aislada de la pared y de la membrana celular del hongo, es reconocida como un ligando por la integrina CR3 (CD11b / CD18) presente en los macrófagos (Long et al., 2003). En ratones, este antígeno inmunodominante ha estado relacionado con la inducción de una respuesta inmune celular dependiente de linfocitos T durante la HPM pulmonar (Deepe y Gibbons, 2001; Gómez et al., 1991; Gomez et al., 1995).
3. El antígeno H, o β -glicosidasa extracelular, participa en el ensamblaje de la pared celular y es utilizado en el diagnóstico de la HPM mediante la prueba de inmunodifusión, que detecta Ac específicos contra este antígeno (Green et al., 1976). En un modelo de HPM pulmonar en ratones, el antígeno H recombinante indujo una respuesta inmune mediada por células productoras de IFN- γ , y protectora contra el hongo, evidenciada por la reducción en la carga fúngica y por una leve mejoría en la supervivencia de los ratones (Deepe y Gibbons, 2001).
4. La histona B2 (H2B) es un antígeno de superficie que, desde la pared celular, ejerce un papel activo en la unión y subsecuente invasión por el hongo del tejido en el hospedero (Shi et al., 2008). Es reconocido por Ac tipo IgM, que alteran la replicación del hongo en los macrófagos, como se ha observado en ratones (Nosanchuk, 2005). Se ha utilizado como antígeno en pruebas IGRA para *Leishmania*.
5. La proteína de estrés térmico Hsp70 tiene como función mantener los polipéptidos en una configuración desplegada para facilitar su transporte a través de las membranas. El estímulo con la Hsp70 indujo una respuesta de hipersensibilidad tardía en ratones inmunizados con levaduras viables o con el antígeno, así como una respuesta inmune protectora mediada por células (Gomez et al., 1992).
6. La dipeptidasa ácida N-acetilada es una enzima que ha sido recientemente identificada como un antígeno de *H. capsulatum*, reconocido por Ac presentes en el suero de pacientes con HPM. Estas peptidasas han sido

halladas en un gran número de hongos, sin embargo, su función exacta aún no ha sido definida (Toyotome et al., 2015).

- Por último, la proteína 4 del filtrado del cultivo (Cfp4) es una glicoproteína secretada abundantemente por *H. capsulatum*, exclusivamente en su forma de levadura. Tampoco tiene función conocida hasta el momento; se sabe que no es necesaria para la virulencia del hongo, pero es reconocida por el sistema inmune humano, específicamente por Ac monoclonales (Holbrook et al., 2014).

La comparación de las secuencias de estas siete proteínas contra la base de datos de secuencias no redundantes del Genbank, muestra que seis de ellas tienen una alta similitud con sus ortólogos en hongos relacionados (tabla 4.1), por lo que la probabilidad de compartir epítopes T inmunogénicos con ellos es alta, como se mostrará más adelante. Las dos proteínas de estrés térmico (Hsp60 y Hsp70) en particular, tienen además ortólogos muy similares en otros patógenos menos relacionados como *Leishmania* y *Mtb*, y en muchos otros microorganismos, como evidencian los resultados con el servidor BLAST obtenidos.

Tabla 4.1. Similitud en secuencia (porcentaje de identidad de aminoácidos) entre las siete proteínas inmunogénicas de *H. capsulatum* y sus ortólogos en hongos relacionados y en otros microorganismos no relacionados

Proteínas de <i>H. capsulatum</i>	Microorganismos patogénicos						
	<i>Emmonsia</i> ID (gi)	<i>B. P. der-</i> <i>matitides</i>	<i>Genbank</i> <i>brasiliensis</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Mtb</i> <i>parva</i>	<i>Asper-</i> <i>gillus</i>	<i>fumigatus</i>
40 Antígeno M (67% cubr.)**	225555166	75	76	62	65	– *	50
Hsp60	4558517	96	96	92	90	52	–
Antígeno H	225557355	86	87	80	67	34	(67 % cubr.)
Histona H2B	32140475	96	96	95	94	43	–
Hsp70	1230567	95	95	92	88	75	46
Dipeptidasa ácida N-acetilada	225557333	88	85	68	43	–	–
Cfp4	225555855	38	34	38	21	–	–

* – La comparación de secuencias no produjo resultados significativos

** Porcentaje de la secuencia blanco cubierto por BLAST. No incluido si es $\geq 85\%$

Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

Estos datos de similitud en secuencia con otros microorganismos relacionados y no relacionados con *H. capsulatum*, nos brindan una explicación plausible al hecho de que en la prueba HistoFerón, las proteínas recombinantes M y Hsp60 produjeran respuestas de IFN- γ en un número significativo de individuos no infectados con *H. capsulatum*. Estas respuestas se deben muy probablemente a la memoria inmune desarrollada por estos individuos ante otras infecciones, que provoca reacciones cruzadas. Los datos de similitud en secuencia sugieren, además, que en un futuro desarrollo de la prueba HistoFerón, no es conveniente utilizar como antígenos recombinantes ninguna de las seis primeras proteínas de la tabla 4.1, porque la especificidad del ensayo muy probablemente sería baja. Sin embargo, estas proteínas pueden aportar péptidos inmunogénicos específicos, como se ilustra más abajo para el antígeno M.

La proteína Cfp4, en cambio, sobresale como candidata a considerar para un desarrollo futuro de la prueba HistoFerón, ya sea en forma de proteína recombinante o como fuente de péptidos inmunogénicos. Además de no tener ortólogos cercanos en hongos relacionados, una búsqueda con el servidor BLAST mostró que no existen proteínas similares a Cfp4 en ningún otro organismo.

4.3.2 Predicción de proteínas de secreción específicas de *H. capsulatum*

Una segunda vía en la búsqueda de posibles antígenos para la prueba HistoFerón, consistió en identificar proteínas distintivas de *H. capsulatum*, en particular, que no tuvieran ortólogos cercanos en otras especies de hongos relacionados filogenéticamente con

H. capsulatum. Con este objetivo, comparamos las secuencias de todas las proteínas anotadas de *H. capsulatum* con las secuencias de los proteomas de otras cuatro especies de hongos. Incluimos también como requisito que las proteínas seleccionadas deben ser secretadas al ambiente extracelular.

Del análisis de ortólogos realizado con el programa OrthoMCL, obtuvimos un total de 11.344 grupos homólogos. De estos grupos, 1.983 estaban compuestos solo por proteínas homólogas de las diferentes cepas de *H. capsulatum*. Como no resulta práctico analizar individualmente cada una de estas proteínas, decidimos enfocarnos en aquellas que estuvieran anotadas (o sea, con función conocida o al menos predicha por métodos automatizados), de las cuales resultaron 41 proteínas. Este conjunto de proteínas se analizó para predecir cuáles de ellas correspondían a proteínas secretadas al medio

exterior por la levadura. Utilizando inicialmente el servidor SignalP, obtuvimos cinco proteínas que pudieran ser liberadas al exterior por la vía clásica de secreción (Petersen et al., 2011). Las 36 proteínas restantes, no identificadas por SignalP como proteínas de secreción, fueron procesadas con el servidor SecretomeP, el cual predijo 13 proteínas asociadas a vías secretoras no clásicas. Las 18 proteínas resultantes, es decir, aquellas predichas por SignalP o SecretomeP, fueron analizadas adicionalmente con el servidor TargetP, que descartó que fueran proteínas mitocondriales. Las 18 proteínas fueron analizadas también con el servidor TMHMM, que predijo la presencia de hélices transmembrana en seis de estas proteínas, que en consecuencia fueron descartadas. Como resultado de esta cadena de predicciones computacionales fueron seleccionadas 12 proteínas, potencialmente específicas de *H. capsulatum*, y potencialmente secretadas al medio extracelular (tabla 4.2).

Como último filtro, utilizamos el servidor Blast para comparar la secuencia de cada una de estas 12 proteínas contra toda la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI, para tener en cuenta posibles similitudes con proteínas de otros microorganismos patógenos, además de las cuatro especies de hongos utilizadas con OrthoMCL. Seis de las 12 proteínas fueron descartadas porque mostraron un grado de similitud en secuencia que consideramos significativo (> 50 % de identidad de aminoácidos en al menos un 70 % de cubrimiento de la secuencia blanco), con proteínas de otros hongos patogénicos, incluyendo diferentes especies de *Emmonsia*, *Blastomyces*, *Sporothrix*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trychophyton*, *Coccidioides*, entre otros.

En la tabla 4.2 se destacan al inicio las seis proteínas distintivas de *H. capsulatum* que finalmente fueron identificadas como posibles antígenos para una prueba Histoferón. A estas seis moléculas se adiciona la proteína Cfp4, identificada anteriormente entre las proteínas de *H. capsulatum* que han sido informadas como inmunogénicas en la literatura.

Es interesante resaltar que Cfp4 no estaba incluida entre las 41 proteínas que analizamos, del conjunto de casi 2000 proteínas sin ortólogos cercanos que obtuvimos con el programa OrthoMCL, por no estar anotada en la base de datos de secuencias, lo cual se debe precisamente a su falta de similitud con proteínas con función conocida. Este hecho evidencia también que existe un enorme espacio por explorar entre el gran número de proteínas no anotadas de *H. capsulatum*.

Tabla 4.2. Proteínas resultantes del análisis de ortología y señales de secreción. Seis proteínas (sobre fondo gris) son distintivas de *H. capsulatum*

Proteínas	Genbank ID (gi)	Tamaño (aa)
Aryl-alcohol dehydrogenase	225557852	105
Beta-lactamase	225558359	148
DUF636 domain-containing protein	225556157	272
Ankyrin repeat protein	225557463	268
Ankyrin repeat protein	225561435	529
Proteoglycan	225556461	666
Chitin binding protein	225559190	203
Alpha-N-acetylglucosamine transferase	225560942	235
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 1A	225560351	279
GARP complex component	225556689	329
Protein kinase	225554838	422
Serine/threonine-protein kinase ppk25	225555253	694

Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

Una limitación importante con respecto a las seis proteínas identificadas como distintivas de *H. capsulatum*, es que hay muy poca información disponible sobre ellas. No se conocen sus niveles de expresión, ni su inmunogenicidad. En general, existen muy pocos datos sobre la inmunogenicidad de proteínas de hongos. Una aproximación inicial hacia el posible uso como antígenos de péptidos derivados de estas proteínas, pudiera ser ensayarlas como proteínas recombinantes, para evaluar si existe memoria inmunológica contra ellas en individuos infectados con *H. capsulatum*.

4.3.3 Predicción de epítopes T en las proteínas identificadas

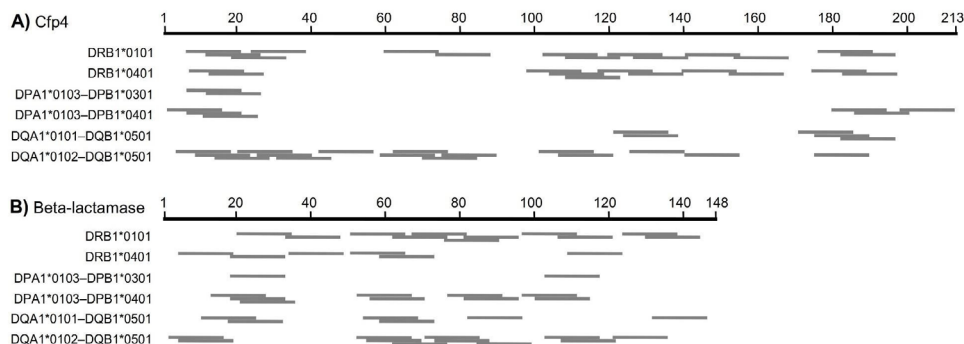
Como se mencionó antes, las pruebas IGRA disponibles en el mercado, para *Mtb* y Citomegalovirus, se basan en el uso de péptidos como antígenos. En el caso de *Mtb*, aunque la última versión del QuantiFERON-TB (QTF-TB) incorpora un segundo tubo que contiene epítopes T de clase I, el diseño de los péptidos de la prueba sigue estando dirigido fundamentalmente a la estimulación de linfocitos T CD4+, mediada por presentación sobre HLA de clase II.

Teniendo en cuenta este importante antecedente, una dirección a considerar en un desarrollo futuro de la prueba HistoFerón es el diseño de péptidos de clase II, a partir de proteínas inmunogénicas de *H. capsulatum*,

como Cfp4 y las otras seis proteínas distintivas identificadas en este estudio. Para ello exploramos inicialmente la opción de hacer un diseño racional de estos péptidos. Utilizamos el servidor web NetMHCII-2.3 para predecir posibles epítopes T de clase II (de 15 aa de longitud) en las siete proteínas distintivas de *H. capsulatum* que identificamos, utilizando la familia de alelos HLA-DR como modelo en este estudio.

La figura 4.1 ilustra los resultados obtenidos para Cfp4 y Beta-lactamasa. Ambas proteínas tienen un tamaño relativamente pequeño, como las proteínas ESAT-6 y CFP-10 en *Mtb*. Como se puede observar, el número y distribución a lo largo de la secuencia de los péptidos predichos varía notablemente de un alelo a otro. Estos resultados, sumados al nivel de incertidumbre que caracteriza aún a los algoritmos de predicción de epítopes de clase II, hace riesgoso la selección de péptidos concretos que puedan ser presentados sobre un amplio espectro de alelos de HLA. Teniendo en cuenta además que las proteínas analizadas son relativamente cortas, por lo cual se puede cubrir gran parte de sus secuencias con un número limitado de péptidos, se justifica entonces un enfoque de fuerza bruta como el utilizado en el diseño del ensayo QTF-TB.

Figura 4.1. Predicción de epítopes de clase II para diferentes alelos DR, DP y DQ, para dos proteínas distintivas de *H. capsulatum*



Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

Los segmentos en gris representan péptidos de 15 aa. En los casos donde el programa predice varios péptidos consecutivos con el mismo núcleo, se representó solo el péptido que contiene el núcleo en posición central.

Exploramos también un enfoque de diseño racional de péptidos inmunogénicos de clase I, utilizando el servidor NetMHC 4.0. Escogimos para nuestro estudio el supertipo de alelo HLA-A*02, presente en una alta proporción en la población humana (Gourraud et al., 2014) definiendo una longitud de 9 aa para los péptidos. La figura 4.2 muestra los resultados de las predicciones obtenidas para dos proteínas: el antígeno M, que ensayamos en forma de proteína recombinante como antígeno de la prueba HistoFerón, y la proteína Cfp4.

Según las predicciones computacionales, el antígeno M contiene un gran número de epítopes T para HLA-A*02, la mayor parte de los cuales son idénticos, o muy similares, a los péptidos correspondientes en hongos relacionados. Dada la alta similitud de las secuencias entre estos hongos, es previsible que este tipo de resultado se repita con otros alelos de HLA. No obstante, en el alineamiento se observa que la similitud entre las secuencias disminuye notablemente hacia el extremo C-terminal de la proteína, provocando que unos pocos epítopes localizados en esa región se diferencien de sus correspondientes péptidos en los demás hongos, por lo que pudieran funcionar como péptidos específicos de *H. capsulatum* en una prueba IGRA.

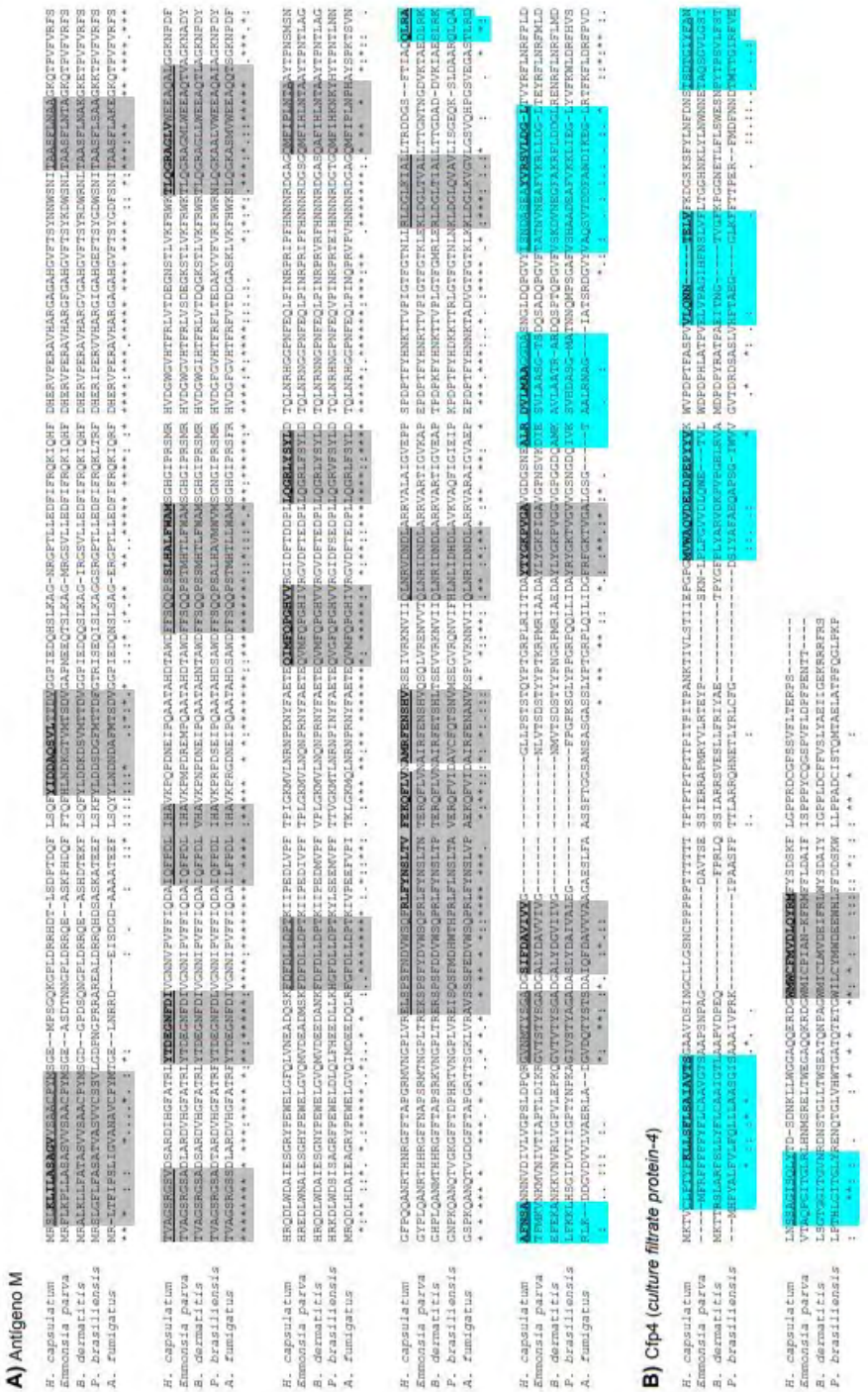
En la proteína Cfp4, como era previsible debido a su escasa similitud con las proteínas más cercanas detectadas con el programa BLAST, la mayor parte de los epítopes T de clase I predichos son únicos de *H. capsulatum*, por lo que resultan atractivos para ser ensayados como potenciales antígenos de una futura prueba HistoFerón. Como era también previsible, obtuvimos resultados análogos con las otras seis proteínas distintivas de *H. capsulatum* que identificamos en el presente estudio.

4.4 Conclusiones

En el presente capítulo hemos aprovechado los datos genómicos disponibles para varias cepas de *H. capsulatum*, así como para una gran variedad de hongos y otros microorganismos patógenos, para explorar y definir posibles estrategias de desarrollo de la nueva prueba HistoFerón, orientadas al uso de antígenos molecularmente definidos que garanticen una alta sensibilidad y especificidad del ensayo.

Utilizando datos de la literatura y varias herramientas bioinformáticas, hemos identificado un conjunto de proteínas de *H. capsulatum* que muestran una similitud nula o baja con proteínas de otros patógenos. En consecuencia, dichas proteínas pudieran ser utilizadas como antígenos

Figura 4.2. Alineamiento de secuencias de dos proteínas de *H. capsulatum* con sus ortólogos en cuatro especies de hongos cercanos filogenéticamente



Fuente: (Rubio-Carrasquilla et al., 2019).

Los epítopes T (HLA-A*02) predichos para *H. capsulatum* están subrayados, y los de alta afinidad están además marcados en negritas. Los segmentos subrayados con más de 9 aa corresponden a dos o más epítopes solapados. Los bloques sombreados en gris corresponden a zonas de secuencias conservadas en al menos tres de las especies de hongos analizadas, como indica la presencia de asteriscos (identidad de aa) y de los doble puntos verticales (sustitución por aa similar) debajo del alineamiento. Los bloques sombreados en verde indican la presencia de epítopes distintivos de *H. capsulatum* específicos en una prueba IGRA, como proteínas enteras y/o como bases para el diseño de péptidos inmunogénicos derivados de sus secuencias.

La proteína Cfp4 en particular resulta muy atractiva como posible antígeno por las siguientes razones: i) es específica de *H. capsulatum*; ii) tiene un tamaño relativamente pequeño, lo que permite cubrir toda su secuencia con un número limitado de péptidos solapantes, iii) se expresa y secreta abundantemente en la fase de levadura del hongo; y iv) se ha comprobado experimentalmente que es inmunogénica.

Otras dos proteínas, aryl-alcohol deshidrogenasa y beta-lactamasa, poseen las dos primeras características y pudieran ser también ensayadas. Quedan aún por explorar un gran número de proteínas no anotadas del proteoma de *H. capsulatum*, que representan una valiosa fuente de potenciales antígenos específicos, que pudieran ser utilizados en futuras versiones de la prueba de HistoFeron.

Conclusiones y perspectivas futuras

5.1 Discusión general

Este es el primer estudio a nivel mundial, que aborda el desarrollo de una prueba tipo IGRA Ag-específica para *H. capsulatum* (HistoFerón) que permita, a futuro, detectar infecciones subclínicas o latentes por este hongo dimórfico en individuos asintomáticos.

Dicho desarrollo surgió a partir de una necesidad sentida en el campo de la micología médica ya que, la intradermorreacción con histoplasmina, prueba que se utilizó para tal efecto durante muchos años a nivel mundial (Carmona FJ, 1971; Queiroz-Telles et al., 2017; Woods, 2016), ya no está disponible en la actualidad debido a sus limitaciones, y a la falta de un producto comercial (con registro sanitario) para realizar dicha prueba que esté autorizado por agencias regulatorias de medicamentos como la FDA de los Estados Unidos, la EMA (*European Medicines Agency*), o el Invima en Colombia.

La carencia de tal prueba (histoplasmina) ha impedido el desarrollo de nuevos estudios epidemiológicos y, por otra parte, no permite actualmente detectar, de manera oportuna, individuos expuestos al hongo con infección latente asintomática, y prevenir en ellos una posible reactivación de la infección en caso de ser candidatos a una terapia inmunosupresora tan utilizadas en la era de la inmunoterapia (Lee et al., 2002; Olson et al., 2011; Tsiodras et al., 2008; Vallabhaneni y Chiller, 2016; Vergidis et al., 2015) 3.94 [95% confidence interval {CI}, 1.06-14.60].

La población estudiada, en este primer abordaje, estuvo conformada por 126 individuos asintomáticos, los cuales fueron asignados a cinco diferentes grupos experimentales: grupo A1 (n=12) – control sano, sin evidencia de exposición a *H. capsulatum*; grupo B-probado (n=13) – infección previa por *H. capsulatum*; grupo B- probable (n=30) – presencia de algún factor de riesgo de exposición al hongo y evidencia serológica a *H. capsulatum*; grupo B-posible (n=63) – presencia de algún factor de riesgo de exposición al hongo;

y grupo A2 (n=8) – control de especificidad, evidencia de exposición y / o infección previa por *M.tuberculosis* (*Mtb*), en ausencia de factor de riesgo de exposición a *H. capsulatum*.

La captación de individuos para el grupo B probado fue particularmente difícil, ya que es muy poco frecuente encontrar individuos inmunocompetentes que padecen HPM, si contamos con que el 70 % de los pacientes en Medellín que sufren HPM tienen de base HIV. Por otro lado, conseguir individuos de los grupos A1 y A2 sin ningún tipo de factor de riesgo de exposición al hongo, en zonas endémicas como es Medellín, con antecedente de frecuencia del 25,1 % de individuos que reaccionaron a la histoplasmina, fue también un criterio difícil de cumplir (Carmona, 1971).

Algunos estudios han demostrado la existencia de variación en los serotipos como resultado del uso de diferentes cepas del hongo (Arango-Bustamante et al., 2013; Markowitz, 1967), con base en estos hallazgos y el punto de partida la prueba IGRA de referencia diseñada para el diagnóstico de infección latente por *Mtb*, decidimos incluir para el desarrollo de la prueba HistoFerón diferentes cepas para producir los extractos antigénicos de los diferentes morfotipos del hongo (Mazurek y Villarino, 2003). El objetivo de este diseño fue poder detectar linfocitos T productores de IFN- γ reactivos a un número mayor y diverso de antígenos presentes en la población heterogénea de individuos previamente expuestos a *H. capsulatum* evaluada en el estudio.

Se utilizó sangre total como muestra a evaluar en la prueba, que evita tener que purificar las células mononucleares, proceso en el cual podría haber pérdida de linfocitos T antígeno específicos durante los lavados, linfocitos que ya están en baja frecuencia, 1 por cada 1.000 a 10.000 células mononucleares (Waldrop et al., 1997), así como de posibles factores necesarios para la producción de IFN- γ , variables que impactarían notablemente en la sensibilidad de la prueba. Además, este tipo de muestra representa una gran ventaja en una futura aplicación de una prueba IGRA con resultados rápidos.

Los *co-cultivos de 24h* permiten detectar preferencialmente el IFN- γ liberado por los linfocitos T de memoria efectora, activados en una infección reciente, reinfecciones de individuos que viven en zonas endémicas, o reactivación de focos endógenos (Mack et al., 2009). Cultivos por tiempos más prolongados (siete días) permiten detectar clones de Linfocitos T de memoria central relacionados con una infección pasada (Marín et al., 2012).

5.1.1 Ensayos IGRA (HistoFerón) con Ags filtrados de micelio y levadura

Los antígenos filtrados de micelio y levadura de *H. capsulatum* son buenos insumos para la exploración inicial de la prueba IGRA, en estudios anteriores se les había atribuido la capacidad para estimular respuesta humoral tanto en humanos como en ratones y solo en ratones la respuesta celular (Deepe y Durose, 1995; Deepe y Gibbons, 2001; Green et al., 1976; Guimarães et al., 2008; Guimarães et al., 2006; Johnson et al., 2002; Sá-Nunes et al., 2005; R. Zancopé-Oliveira et al., 1993; R. M. Zancopé-Oliveira et al., 1999b). Adicional a estos hallazgos, en el presente estudio se pudieron detectar características inmunogénicas en todos los preparados antigénicos ensayados, ya que el estímulo de las células de los individuos con algún grado de exposición a *H. capsulatum*, con cualquiera de estos Ag, indujo una mayor liberación de IFN- γ en comparación con la obtenida en los cultivos no estimulados.

Tanto las histoplasminas como los extractos de levadura resultaron ser altamente específicos, permitiendo diferenciar entre la mayoría de los casos comprobados de HPM (grupo B-probado) y la mayoría de los individuos no expuestos al hongo (grupos A1 y A2). En general, las concentraciones de IFN- γ obtenidas por el estímulo con los Ag de secreción de las dos levaduras fueron mayores que las generadas por las dos histoplasminas, aunque las respuestas a estos últimos preparados mostraron una menor dispersión, lo cual se refleja en las diferencias estadísticamente significativas obtenidas entre el grupo B-probado y los restantes, en particular para la histoplasmina G184.

Se debe señalar que las histoplasminas utilizadas en nuestra prueba IGRA (HistoFerón) fueron procesadas por cromatografía, utilizando una columna de sefarosa CM. Este procedimiento remueve el Ag polisacárido C, responsable de gran parte de la reacción cruzada observada en las pruebas serológicas realizadas en la práctica clínica, y concentra los Ag M y H, que aportan en gran medida a la especificidad de estas pruebas (Azuma et al., 1993).

En contraste con lo anterior, los preparados antigénicos utilizados en las pruebas serológicas realizadas en este estudio (inmunodifusión y fijación de complemento), así como los filtrados de secreción de levaduras utilizados en la prueba HistoFerón, no fueron procesados por cromatografía, lo que sugiere la presencia de una alta concentración del polisacárido C en estos preparados (Zancopé-Oliveira et al., 1993).

Esto, a su vez, pudiera explicar los mayores niveles de IFN- γ obtenidos como respuesta a las levaduras. Otro dato relevante es que los filtrados de levadura que utilizamos fueron obtenidos a partir del sobrenadante del cultivo. En un estudio realizado hace varias décadas, Reeves y colaboradores (Reeves et al., 1972) demostraron que el Ag soluble es más específico que el Ag de la levadura completa, utilizado en las pruebas serológicas para el diagnóstico de la HPM.

Los resultados obtenidos en este primer abordaje de desarrollo de la prueba nos permiten concluir que, con el uso de los extractos del micelio y de la levadura de *H. capsulatum* es posible detectar un número mayor de clones de linfocitos T Ag-específicos productores de IFN- γ circulantes en sangre de individuos infectados o expuestos a este hongo.

5.1.1.1 Nivel de precisión y poder de la prueba HistoFerón

Con el objetivo de definir un punto de corte plausible en el nivel de concentración de IFN- γ , que permita distinguir, con alta sensibilidad y especificidad, infecciones subclínicas por *H. capsulatum*, realizamos un conjunto de gráficos de dispersión, que facilitaran el análisis del comportamiento en la producción de esta citoquina por los diferentes grupos de individuos evaluados (capítulo III).

Estos gráficos fueron construidos para cada una de las seis parejas posibles en el conjunto de los cuatro preparados antigénicos seleccionados (las dos histoplasminas y los dos filtrados de levadura). Así, con base al análisis visual, establecimos un valor de corte de 20 pg / ml, con el cual la mayor parte de los casos comprobados de HPM (grupo B- probado) quedan agrupados en el cuadrante superior derecho de los gráficos, mientras que los casos no expuestos al hongo (grupos A1 y A2) quedan agrupados en el cuadrante inferior izquierdo. En este caso el punto de corte no fue definido con base en cálculos estadísticos, la razón es que los datos no se ajustaron a una distribución de probabilidad particular dada la alta dispersión de estos, sobre todo en los grupos B posible y probable.

En este sentido, los gráficos de dispersión para las diferentes combinaciones de Ag revelan que existe una marcada correlación entre las respuestas de IFN- γ a las dos histoplasminas utilizadas, y entre las respuestas a los dos extractos de levaduras. En cambio, no se observa correlación en las respuestas para ninguna de las parejas compuestas por una histoplasmina y un extracto de levadura. Estos resultados sugieren que la composición antigénica de

ambas histoplasminas es muy similar entre sí, y lo mismo para los dos extractos de levadura. Sugieren también que hay diferencias significativas entre los dos tipos de preparados antigénicos.

Algunos datos ya han sido publicados acerca de esta variación en la composición antigénica del hongo. Edwards y colaboradores (Edwards et al., 2013) demostraron a través de un análisis del transcriptoma, que existe expresión de genes específicos para cada linaje y fase del hongo. Estos investigadores encontraron que 6 al 9 % de los genes fueron diferencialmente regulados entre la fase del micelio y la levadura y que 7,6 % de los genes fueron expresados diferencialmente en levaduras de cepas diferentes: estos genes potencialmente están relacionados con la patogénesis (Edwards et al., 2013).

La sensibilidad de la prueba HistoFerón con cada uno de los cuatro Ag evaluados mostró valores entre 69-92 %, siendo menor la obtenida con los Ag de la levadura. Cuatro de los 13 individuos del grupo B-probado presentaron respuesta de IFN- γ por debajo del punto de corte de 20pg / ml, para al menos uno de los Ag de la levadura. Las diferencias en las respuestas implican que es importante incluir en el protocolo de la prueba los dos tipos de Ag –tanto histoplasminas como los de levadura.

La especificidad de la prueba HistoFerón fue muy alta, entre 85 % y 95 %, con los cuatro Ag de *H. capsulatum*. Tan solo en dos de los 12 individuos del grupo A1, y en otros dos de los ocho individuos del grupo A2, se observó reactividad cruzada para uno o más Ags. La reactividad cruzada obtenida con los dos individuos del grupo A2 es explicable por la presencia de estructuras antigénicas comunes en la pared de las micobacterias y de varios hongos (incluyendo *H. capsulatum*), tales como arabinogalactanos, arabinomananos, mananos, glucanos y arabinosa (Wheat et al., 1986).

Por otra parte, la positividad de la prueba HistoFerón en los dos individuos del grupo A1 puede ser debida a factores no controlados en el estudio, por ejemplo, el desconocimiento sobre una posible exposición a factores de riesgo, que haya producido una infección por *H. capsulatum*, o una posible reacción cruzada con la memoria inmune generada por alguna vacuna. Esta misma explicación puede ser aplicable también a los dos individuos del grupo A2.

Los valores predictivos positivos y negativos obtenidos en nuestro estudio, o sea, la probabilidad de tener o no la infección habiendo obtenido un resultado positivo o negativo en la prueba IGRA, fueron también muy altos: 82–95 % y 77–92 %, respectivamente.

Varios estudios se han propuesto encontrar un significado clínico de los resultados positivos en las pruebas IGRA, cuando éstas han sido realizadas con el objetivo de predecir casos de TB activa dentro de una proporción de individuos con infección por *Mtb*. Uno de estos estudios fue realizado en una cohorte de 2060 contactos de casos índices de TB, contrastada con una muestra representativa de la población general de Medellín (del Corral et al., 2009). En dicho estudio se evaluó la respuesta de IFN- γ como marcador pronóstico del desarrollo de la TB estimulada por un Ag específico de *Mtb* (CFP10), y los individuos fueron seguidos durante dos años. Se encontró una incidencia de 7 casos nuevos por 1000 personas por año, y de ellos, los niños menores de 5 años representaron el 21,6 %. Lo más llamativo del estudio es que los individuos que desarrollaron TB presentaron un aumento en la concentración de IFN- γ , lo cual es explicado por los autores como una consecuencia de las constantes reinfecciones que se generaran en una ciudad con una alta carga epidemiológica de TB, como lo es Medellín (Corral et al., 2009).

Con el objetivo de facilitar el uso de la prueba HistoFerón por los médicos en aplicaciones futuras en la práctica clínica, se realizaron cálculos de parámetros consolidados del poder y calidad de la prueba definiendo como "caso positivo" (expuesto a *H. capsulatum*) a los individuos que presentan una concentración de IFN- γ por encima de 20 pg / ml para al menos dos de los cuatro Ag evaluados. Con este criterio de decisión obtuvimos valores superiores de sensibilidad (92 %), especificidad (90 %), y valores predictivos positivo (86 %) y negativo (95 %).

Utilizando este criterio de positividad a la prueba IGRA, 20 % de los individuos del grupo B-probable y 30 % del grupo B-posible fueron detectados como casos positivos. Recordemos que estos grupos fueron definidos con base en dos criterios de clasificación: i) la presencia de factores de riesgo de exposición a *H. capsulatum* y ii) (solo para el grupo B-probable) la detección de un título bajo de Ac a los Ag de la levadura en la prueba de fijación de complemento.

Es posible que la ausencia de Ac en la fijación de complemento en el grupo B-posible, sea producto de la negativización de las serologías varios años después de la exposición al hongo. Resaltamos de esta manera, la utilidad de la prueba IGRA porque fue capaz de detectar la infección por el hongo en los individuos del grupo B- posible, en contraste con los resultados negativos de las pruebas serológicas.

Estos resultados coinciden con los publicados por Carmona Fonseca (Carmona , 1971), quien describe una prevalencia de la infección subclínica por *H. capsulatum* en Medellín de 25,1 %, detectada por la prueba de intradermorreacción con la histoplasmina (Carmona , 1971). Por otro lado, (L. Joseph Wheat, 2001) demuestra que la positividad a las pruebas serológicas está relacionada con la intensidad de la exposición al hongo y la severidad de los síntomas, informando una positividad del 18 % en individuos asintomáticos, 75-86 % en pacientes sintomáticos y 100 % en pacientes con síntomas severos.

Importante destacar que los valores de sensibilidad (92 %), especificidad (90 %) y valores predictivos positivo (86 %) y negativo (95 %) calculados para este *primer abordaje* de la prueba HistoFerón son altamente valiosos y comparables, en cierta medida, con aquellos calculados para las pruebas tipo IGRA ya validadas y comercializadas como son las diferentes generaciones de la prueba Quantiferon para *M. tuberculosis* y la de CMV.

5.1.1.2 Respuesta inmune humoral (Pruebas serológicas) versus respuesta inmune celular (HistoFerón)

En este estudio nosotros observamos una clara tendencia de la respuesta inmune serológica a desaparecer con el tiempo. La seroconversión negativa observada en algunos pacientes pocos años después del episodio de la HPM, coincide con estudios que describen la desaparición de los anticuerpos específicos para *H. capsulatum* en individuos que resuelven la enfermedad activa y permanecen sanos a través de los años (Fernandez-Andreu et al., 1994; Wheat, 1993).

Por lo tanto, es sorprendente observar la persistencia de la respuesta inmune humoral en otros individuos hasta 23 años después de la infección. Tal persistencia sugiere la presencia de focos latentes del hongo (Sifuentes-Osorio et al., 2012), como se ha evidenciado indirectamente en pacientes con VIH que viven en regiones no endémicas y desarrollan la HPM inclusive 50 años después de la primoinfección una vez son inmunosuprimidos por causa del virus (J. Wheat, 1995), así como en pacientes bajo terapia biológica inmunosupresora (Ashbee et al., 2008; Tsiodras et al., 2008).

Sin embargo, no podemos descartar que alguno de los individuos de este estudio que mantienen la respuesta humoral después de varios años, podrían haber estado en contacto con el hongo en ocasiones posteriores a la primoinfección, las cuales pueden haber estimulado su sistema inmune sin causar una recurrencia de la enfermedad. Tal como ha sucedido en la ciudad

de Indiana en EEUU, en donde reportaron un brote de HPM después de una misma exposición ambiental en individuos con o sin SIDA, resaltando el hecho de que los pacientes con SIDA también pueden sufrir HPM diseminada después de la exposición al microorganismo por una fuente exógena (McKinsey et al., 1997).

En contraste, la respuesta inmune celular en la prueba HistoFerón (al menos a uno de los cuatro antígenos), estuvo presente en casi todos los individuos del grupo B probado independiente del tiempo transcurrido desde la primoinfección. Estos resultados sugieren que la memoria inmune celular a *H. capsulatum* es más duradera que la memoria humoral. Una posible explicación a esta observación proviene del hecho de que este hongo es un patógeno intracelular, por lo tanto, activa el procesamiento y presentación de antígenos en las moléculas MHC clase II por células fagocíticas en mayor medida (Cain y Deepe, 2000; Holbrook y Rappleye, 2008), que la rama humoral del sistema inmune.

5.1.2 Ensayos de la prueba HistoFerón con AgM y HSp60, recombinantes (capítulo III)

Utilizamos los Ag M y HSp60, producidos como proteínas recombinantes en *E. coli*, para estimular la respuesta de los linfocitos T en los individuos de nuestro estudio. Al realizar la medición de IFN- γ en los sobrenadantes de co-cultivos de sangre total retadas con estos Ag, obtuvimos altos niveles de IFN- γ , pero no solo en co-cultivos a partir de sangre de individuos con infección probada o con factores de riesgo (grupos B), sino también en aquellos de los grupos A y C, o sea, en controles negativos.

Estas respuestas poco específicas pueden deberse a varios factores: i) para el caso del Ag HSp60, una causa probable es la alta similitud en secuencia que existe entre la proteína de *H. capsulatum* y las de otros microorganismos comunes en la práctica clínica, por ejemplo, un 50 % de identidad de aa. con su proteína ortóloga en *Escherichia coli* (Gomez et al., 1995; Allan Jefferson Guimarães et al., 2008; R. M. Zancopé-Oliveira et al., 1999b); y ii) en relación al AgM se conoce que contiene no solo epítopes específicos, sino que también comparte epítopes con catalasas de diferentes microorganismos, que pudieran producir reacciones cruzadas (Guedes et al., 2003; Zámocký y Koller, 1999).

En ambos casos, el hecho de utilizar estos Ag en forma pura y en mayor cantidad (en comparación con el contenido de estas moléculas en los filtrados)

debe producir un mayor nivel de presentación de los epítopes de esta molécula, pudiendo incorporar epítopes, que son crípticos en *H. capsulatum*, pero dominantes en otros microorganismos (Dominguez et al., 2011).

Es importante destacar también que, al ser producidas de manera recombinante en bacteria, estas proteínas ya no están glicosiladas, lo cual permitiría el procesamiento y presentación de péptidos que en el Ag nativo del hongo, están protegidos de este procesamiento por las cadenas de glicanos unidas covalentemente a la proteína.

Debido a que ambos Ag recombinantes (AgM y HSP60) mostraron ser altamente inmunogénicos (inductores de altos niveles de IFN- γ) pero con baja especificidad (reactividad de los grupos A1 y A2, o sea, en controles negativos), decidimos explorar por métodos bioinformáticos una serie de péptidos cuyas secuencias específicas de *H. capsulatum* sirvan para ser aplicadas en una segunda generación de la prueba HistoFérón como perspectiva futura.

5.1.3 Diseño de una futura generación de la prueba HistoFérón con antígenos molecularmente definidos (capítulo IV)

Exploramos opciones para el desarrollo de una nueva generación de la prueba HistoFérón, basada en nuevos antígenos molecularmente definidos, aplicando dos estrategias de búsqueda con metodologías y herramientas bioinformáticas para identificar posibles epítopes específicos de: i) proteínas de *H. capsulatum* que ya han sido caracterizadas como moléculas inmunogénicas en anteriores trabajos y ii) proteínas específicas de *H. capsulatum*, o sea, proteínas que no tienen ortólogos cercanos en otros hongos relacionados.

De la literatura, identificamos siete proteínas de *H. capsulatum* con inmunogenicidad (humoral y / o celular) probada, incluyendo el antígeno M y la proteína de estrés térmico Hsp60, ensayadas como proteínas recombinantes en este trabajo. Desafortunadamente, seis de estas proteínas tienen ortólogos altamente similares en muchos otros microorganismos patogénicos en humanos, por lo que no debieran ser utilizadas como antígenos en una prueba HistoFérón, al menos en forma de proteínas enteras (recombinantes). No obstante, no se debe descartar *a priori* la posibilidad de que estas proteínas puedan aportar péptidos inmunogénicos específicos, como ilustramos en el caso del antígeno M.

La proteína Cfp4, en cambio, se muestra como un candidato prometedor a considerar para un desarrollo futuro de la prueba HistoFérón, ya sea en

forma de proteína recombinante o como fuente de péptidos inmunogénicos. Además de no tener ortólogos cercanos en hongos relacionados, una búsqueda con el servidor BLAST mostró que no existen proteínas similares a Cfp4 en ningún otro organismo.

Por otro lado, identificamos seis proteínas que no tienen ortólogos cercanos en otras especies de hongos relacionados filogenéticamente con *H. capsulatum*, y que, según predicciones computacionales, deben ser secretadas al medio extracelular: proteoglicano, proteína que contiene dominio DUF636, dos proteínas con repeticiones de anquirina, Aril alcohol deshidrogenasa y beta-lactamasa. Es importante tener en cuenta, no obstante, que estas proteínas no han sido caracterizadas en cuanto a sus niveles de expresión y capacidad inmunogénica, por lo que su posible uso tiene asociada una mayor incertidumbre. Para caracterizar la inmunogenicidad de estas proteínas, y validarlas, así como posibles fuentes de péptidos, es recomendable hacer ensayos iniciales con sus variantes recombinantes, en individuos que fueron infectados con *H. capsulatum*.

De forma exploratoria, realizamos predicciones de epítopes T de clase II restringidos a alelos de la familia HLA-DR, para las proteínas Cfp4 y beta-lactamasa, identificadas como antígenos distintivos de *H. capsulatum* en este estudio. Evidenciamos teóricamente que en el diseño de péptidos dirigidos a estimular linfocitos T CD4+, es más efectivo desde el punto de vista práctico, al menos para proteínas de pequeño tamaño, aplicar un enfoque de "fuerza bruta" (cubrir toda la secuencia de la proteína) como el empleado en el diseño del ensayo QFT-TB (Nagai et al., 2014), que escoger un número limitado de péptidos a partir de un diseño racional.

Se realizaron también predicciones de epítopes T para el supertipo del alelo HLA-A*02, el cual está presente en una alta proporción de la población humana y para tener en cuenta en una futura aplicación en individuos con bajo recuento de linfocitos T CD4+ como es el caso de los individuos inmunodeprimidos con el VIH (Gourraud et al., 2014) in the major histocompatibility complex (MHC. En la proteína Cfp4, como era previsible debido a su escasa similitud con las proteínas más cercanas detectadas con el programa BLAST, la mayor parte de los epítopes T de clase I predichos son únicos de *H. capsulatum*, por lo que resultan atractivos para ser ensayados como potenciales antígenos de una futura prueba HistoFerón. Como era también previsible, obtuvimos resultados análogos con las otras seis proteínas distintivas de *H. capsulatum* que identificamos en el presente estudio.

5.2 Conclusiones

1. La prueba IGRA específica para *H. capsulatum* (HistoFerón), desarrollada por primera vez en el presente trabajo, permitió discriminar entre individuos no infectados e individuos asintomáticos infectados por el hongo, con una sensibilidad de 92 % y una especificidad de 90 %, comparables con los valores correspondientes informados para las pruebas IGRA disponibles para otros microorganismos.
2. Los filtrados de micelio y levadura de *H. capsulatum* ensayados en el presente estudio estimularon respuestas de IFN- γ en muestras de sangre total de individuos infectados con el hongo, mostrando además una alta especificidad. En general, las concentraciones de IFN- γ obtenidas por el estímulo con las dos histoplasminas, tuvieron una menor dispersión en comparación con los extractos de levadura.
3. Las proteínas recombinantes ensayadas -el antígeno M y la proteína de estrés térmico Hsp60- resultaron altamente inmunogénicas (inductoras de altos niveles de IFN- γ), pero mostraron una baja especificidad. En general, las proteínas inmunogénicas conocidas de *H. capsulatum* no son buenos candidatos como antígenos para la prueba Histoferón, porque tienen ortólogos muy cercanos en muchos otros microorganismos que son patógenos para el ser humano.
4. El estudio indica que la prueba HistoFerón tiene una mayor capacidad de detectar infecciones antiguas, en comparación con las pruebas serológicas.
5. Es necesario realizar estudios con un número mayor de individuos, que nos permitan determinar con una mejor estadística el poder de exactitud y discriminación de la prueba Histoferón.
6. La proteína Cfp4 es un candidato prometedor para ser ensayado en una segunda generación de la prueba HistoFerón, por varias razones: es específica de *H. capsulatum*; se expresa y secreta abundantemente en la fase de levadura; y es inmunogénica. Adicionalmente, es de pequeño tamaño, lo cual permite cubrir toda su secuencia con un número limitado de péptidos solapantes.
7. Hemos identificado un pequeño conjunto de proteínas distintivas de *H. capsulatum* como candidatos a explorar en calidad de posibles antígenos de la prueba HistoFerón. No obstante, es importante considerar

que para estas proteínas no conocemos aún sus niveles de expresión y capacidad inmunogénica.

8. La prueba HistoFerón desarrollada en este estudio, constituye un prometedor método de tamizaje para detectar infección subclínica o latente por *H. capsulatum*, incluso después de décadas de haber ocurrido el evento infeccioso.

5.3 Perspectivas futuras

Para poder aplicar la prueba en la práctica clínica, se requiere su validación en una cohorte mayor de individuos expuestos y no expuestos al hongo, preferentemente procedentes de diferentes lugares de Colombia y de otros países, lo que permitiría probar la efectividad ante infecciones producidas por diferentes cepas de *H. capsulatum*, e incluir mayor variabilidad genética de los hospederos. Además, es importante caracterizar más profundamente y mejorar la calidad de la mezcla de los Ag utilizados y estandarizar su producción, lo cual podría disminuir las posibles reacciones cruzadas, logrando así una mayor especificidad del ensayo. Dentro de los individuos no expuestos a *Histoplasma* sería importante incluir, la evaluación de individuos infectados con hongos como *Aspergillus*, *Candida*, *Paracoccidioides*, *Coccidioides*, *Blastomyces* y *Emmonsia*, los cuales han estado relacionados con reacción cruzada en las pruebas serológicas.

En cuanto a la utilidad clínica de un resultado positivo en individuos con alto riesgo para desarrollar HPM, el médico tiene que valorar este resultado a la luz del nivel del riesgo presente en cada individuo en particular, y de acuerdo con esta evaluación decidir si es recomendable la aplicación de un tratamiento profiláctico. Además, esta evaluación por HistoFerón puede ser complementada con la prueba de antigenuria, lo que permitiría hacer un seguimiento de la respuesta celular y del nivel de replicación del hongo durante el proceso de inmunosupresión.

Es recomendable caracterizar las poblaciones celulares productoras de IFN- γ presentes en los co-cultivos estimulados con los diferentes Ag, puesto que esto permitiría determinar el tipo de poblaciones de linfocitos T productores de IFN- γ particulares, relacionadas con la exposición reciente o antigua de los individuos asintomáticos a *H. capsulatum*.

Asimismo, sería pertinente cuantificar, en los sobrenadantes de los co-cultivos, los distintos perfiles de citoquinas, ya que esto ofrecería una visión

más amplia del tipo de respuesta que desarrolla cada individuo. Finalmente, este conocimiento ayudaría a un mejor entendimiento de la naturaleza en la interacción hospedero-patógeno (inmunopatogénesis) y a los posibles estados que se pueden derivar de ella, desde la presencia de inmunidad adaptativa en ausencia del microorganismo hasta el desarrollo de la enfermedad activa.

El hecho de poder contar con una “primera generación” de prueba IGRA - HistoFerón para el modelo de infección por *H. capsulatum* abre la posibilidad de realizar futuros estudios que permitan valorar el riesgo de desarrollo de HPM, medir el valor potencial de las vacunas y poder realizar seguimiento de la respuesta inmune de los pacientes que reciben tratamiento a través del tiempo, entre otras aplicaciones.

La aplicabilidad clínica futura de la prueba HistoFerón tendría varias poblaciones de importancia donde su empleo sería de mucha relevancia y podría servir de biomarcador para:

- i) *definir políticas de salud ocupacional*, por ejemplo, en la vigilancia epidemiológica de poblaciones que trabajen en la preparación y manipulación de compostaje en grandes cantidades, material cuyo uso viene en crecimiento, lo que ha hecho que se creen empresas para su preparación. En ese sentido, existen estudios recientes que informan sobre contaminación con *H. capsulatum* hasta en un 8,5 % de las 201 muestras de compostaje analizadas, a pesar de cumplir la mayoría de ellas con la normatividad exigida por entidades gubernamentales nacionales (Gómez et al., 2018b). Así mismo, hay reportes de brotes (microepidemias) causados por la generación de aerosoles durante la manipulación de abonos orgánicos infestados con este hongo el cual fue aislado a partir del material manipulado (Jiménez et al., 2002).
- ii) *elegir conducta y manejo terapéutico* en población o grupos de pacientes que vayan a ser sometidos a terapias inmunosupresoras, como son aquellos con enfermedades inflamatorias mediadas por la inmunidad, IMID (del inglés: *immune-mediated inflammatory diseases*), entre las cuales están artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante. Es recomendable que los médicos tratantes estén atentos a conocer si hay sospecha de una infección latente por *H. capsulatum* en sus pacientes antes de iniciar este tipo de terapias (principalmente con los bloqueadores o inhibidores del TNF- α) para evitar posibles reactivaciones de focos latentes que permitan el desarrollo de formas severas de HPM (Vallabhaneni y Chiller, 2016).

iii) *detectar población infectada por el hongo* después de tener riesgo de exposición en actividades recreacionales, turísticas, profesionales, relacionadas con visitas a cuevas infestadas con murciélagos o lugares donde haya acúmulo de excretas de aves (Queiroz-Telles et al., 2017; Scully y Baddley, 2018).

La prueba HistoFerón adquiere mayor importancia en estudios epidemiológicos, como herramienta para evaluar la magnitud real de la infección en nuestra población.

Se abre la posibilidad de una futura aplicación de la prueba HistoFerón en poblaciones de alto riesgo a desarrollar HPM, como la creciente población a ser inmunosuprimida como terapia de otras condiciones de base.

Referencias

- Aagaard, C., Brock, I., Olsen, A., Ottenhoff, T. H. M., Weldingh, K., y Andersen, P. (2004). Mapping Immune Reactivity toward Rv2653 and Rv2654: Two Novel Low-Molecular-Mass Antigens Found Specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(5), 812–819. <https://doi.org/10.1086/381679>
- Abate, D., Saldan, A., Forner, G., Tinto, D., Bianchin, A., y Palu, G. (2014). Optimization of interferon gamma ELISPOT assay to detect human cytomegalovirus specific T-cell responses in solid organ transplants. *Journal of Virological Methods*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.036>
- Adenis, A. A., Valdes, A., Cropet, C., McCotter, O. Z., Derado, G., Couppie, P., ... Nacher, M. (2018). Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(18), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30354-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30354-2)
- Adenis, A. a, Aznar, C., y Couppié, P. (2014). Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. *Current Tropical Medicine Reports*, 1, 119–128. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0017-8>
- Aidé, M. A. (2009). Chapter 4--histoplasmosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia : Publicação Oficial Da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, 35(11), 1145–1151. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100013>
- Allendoerfer, R., y Deepe, G. S. (1998). Blockade of endogenous TNF- α exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *Journal of Immunology*, 160(12), 6072–6082. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1806>
- Allendoerfer, R., y Deepe, G. S. (1997). Intrapulmonary response to Histoplasma capsulatum in gamma interferon knockout mice. *Infection and Immunity*, 65(7), 2564–2569. <https://doi.org/9199420>
- Allendoerfer, R., Maresca, B., y Deepe, G. S. (1996). Cellular immune responses to recombinant heat shock protein 70 from Histoplasma capsulatum. *Infection and Immunity*, 64(10). <https://doi.org/10.1128/iai.64.10.4123-4128.1996>
- Allendörfer, R., Brunner, G. D., y Deepe, G. S. J. (1999). Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. *Journal of Immunology*, 162(12), 7389–7396. <https://doi.org/10358191>

- Almeida, M. A., Baeza, L. C., Almeida-Paes, R., Bailão, A. M., Borges, C. L., Guimarães, A. J., ... Zancopé-Oliveira, R. M. (2021). Comparative Proteomic Analysis of Histoplasma capsulatum Yeast and Mycelium Reveals Differential Metabolic Shifts and Cell Wall Remodeling Processes in the Different Morphotypes. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.640931>
- Andersen, P., Munk, M. E., Pollock, J. M., y Doherty, T. M. (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet (London, England)*, 356(9235), 1099–1104. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02742-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02742-2)
- Arango-Bustamante, K., Restrepo, A., Cano, L. E., De Bedout, C., Tobón, A. M., y González, A. (2013). Diagnostic value of culture and serological tests in the diagnosis of histoplasmosis in HIV and non-HIV Colombian patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(5), 937–942. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0117>
- Arango, M., Castañeda, E., Agudelo, C. I., De Bedout, C., Agudelo, C. A., Tobón, A., ... Restrepo, A. (2011). Histoplasmosis: results of the Colombian national survey, 1992–2008. *Biomédica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 31(3), 344–356. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572011000300007>
- Aravalli, R. N., Hu, S., Woods, J. P., y Lokensgard, J. R. (2008). Histoplasma capsulatum yeast phase-specific protein Yps3p induces Toll-like receptor 2 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-30>
- Arend, S. M., Geluk, A., Meijgaarden, K. E. V. A. N., Jaap, T., Theisen, M., Andersen, P., y Ottenhoff, T. O. M. H. M. (2000). Antigenic Equivalence of Human T-Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis -Specific RD1-Encoded Protein Antigens ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 and to Mixtures of Synthetic Peptides. *Infection and Immunity*, 68(6), 3314–3321. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3314-3321.2000>. Updated
- Arend, S. M., Thijsen, S. F. T., Leyten, E. M. S., Bouwman, J. J. M., Franken, W. P. J., Koster, B. F. P. J., ... Bossink, A. W. J. (2007). Comparison of two interferon- γ assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(6), 618–627. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1099OC>
- Armstrong, P. A., Beard, J. D., Bonilla, L., Arboleda, N., Lindsley, M. D., Chae, S.-R., ... Vallabhaneni, S. (2017). Outbreak of Severe Histoplasmosis Among Tunnel Workers—Dominican Republic, 2015. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1067>
- Ashbee, H. R., Evans, E. G. V., Viviani, M. A., Dupont, B., Chryssanthou, E., Surmont, I., ... Tintelnot, K. (2008). Histoplasmosis in Europe: Report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Medical Mycology*, 46(1), 57–65. <https://doi.org/10.1080/13693780701591481>

- Azar, M. M., y Hage, C. A. (2017a). Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. *Clinics in Chest Medicine*, 38(3), 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2017.04.004>
- Azar, M. M., y Hage, C. A. (2017b). Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1612–1620.
- Azuma, I., Kanetsuna, F., Tanaka, Y., Yamamura, Y., y Carbonell, L. M. (1974). Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blasomyces dermatitidis*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 54(1), 111–125. <https://doi.org/10.1007/BF02055979>
- Barcellini, L., Borroni, E., Brown, J., Brunetti, E., Codecasa, L., Cugnata, F., ... Cirillo, D. M. (2016). First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/13993003.02033-2015>
- Barth, R. E., Mudrikova, T., y Hoepelman, A. I. M. (2008). Interferon-gamma release assays (IGRAs) in high-endemic settings: could they play a role in optimizing global TB diagnostics?. Evaluating the possibilities of using IGRAs to diagnose active TB in a rural African setting. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(6). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.026>
- Bartu, V., Havelkova, M., y Kopecka, E. (2008). QuantiFERON®-TB Gold in the Diagnosis of Active Tuberculosis. *Journal of International Medical Research*, 36(3), 434–437. <https://doi.org/10.1177/147323000803600307>
- Basso, R. P., Poester, V. R., Benelli, J. L., Stevens, D. A., Zogbi, H. E., Vasconcellos, I. C. da S., ... Xavier, M. O. (2021). COVID-19-Associated Histoplasmosis in an AIDS Patient. *Mycopathologia*, 186(1). <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00505-1>
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G., y Brunak, S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17(4), 349–356. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh037>
- Benedict, K., y Mody, R. K. (2016). Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 22(3), 370–378. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151117>
- Bonifaz, A., Vázquez-González, D., y Perusquía-Ortiz, A. M. (2011). Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 9(9), 705–716. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2011.07731.x>
- Borgström, E., Andersen, P., Atterfelt, F., Julander, I., Källenius, G., Maeurer, M., ... Gaines, H. (2012). Immune Responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA and Multiplex Technology for Diagnosis of *M. tuberculosis* Infection; IP-10 Is a Promising Marker. *PLoS ONE*, 7(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043438>

- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., y Wiley, D. C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*, 364(6432). <https://doi.org/10.1038/364033a0>
- Bullock, W. E., y Wright, S. D. (1987). Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 165(1), 195–210. <https://doi.org/10.1084/jem.165.1.195>
- Cáceres, D. H., Gómez, B. L., Restrepo, Á., y Tobón, Á. M. (2012). Histoplasmosis y sida: factores de riesgo clínicos y de laboratorio asociados al pronóstico de la enfermedad. *Infectio*, 16(Supl 3), 44–50. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(12\)70026-7](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70026-7)
- Caceres, D. H., Knuth, M., Derado, G., y Lindsley, M. D. (2019). Diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in advanced HIV: A meta-analysis of assay analytical performance. *Journal of Fungi*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/jof5030076>
- Cáceres, D. H., Samayoa, B. E., Medina, N. G., Tobón, A. M., Guzmán, B. J., Mercado, D., ... Gómez, B. L. (2018). Multicenter validation of commercial antigenuria reagents to diagnose progressive disseminated histoplasmosis in people living with HIV/AIDS in two Latin American countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(6). <https://doi.org/10.1128/JCM.01959-17>
- Cain, J. A., y Deepe, G. S. (2000). Interleukin-12 neutralization alters lung inflammation and leukocyte expression of CD80, CD86, and major histocompatibility complex class II in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity*, 68(4), 2069–2076. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2069-2076.2000>
- Cardona, N. I., Moncada, D. M., y Gómez-Marin, J. E. (2015). A rational approach to select immunogenic peptides that induce IFN- γ response against *Toxoplasma gondii* in human leukocytes. *Immunobiology*, 220(12), 1337–1342. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.07.009>
- Carmona FJ. (1971). Análisis estadístico y ecológico-epidemiológico de la sensibilidad a la histoplasmina en Colombia 1950-1968. *Antioquia Médica*, 21(2), 100–154.
- Carr, J., y Shearer, G. (1998). Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Bacteriology*, 180(24). <https://doi.org/10.1128/jb.180.24.6697-6703.1998>
- Chapey, E., Wallon, M., Debize, G., Rabilloud, M., y Peyron, F. (2010). Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using a whole-blood gamma interferon release assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 41–45. <https://doi.org/10.1128/JCM.01903-09>
- Chastain, D. B., Henao-Martínez, A. F., y Franco-Paredes, C. (2017). Opportunistic Invasive Mycoses in AIDS: Cryptococcosis, Histoplasmosis, Coccidioidomycosis,

- and Talaromycosis. *Current Infectious Disease Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0592-7>
- Chaves, F. A., Lee, A. H., Nayak, J. L., Richards, K. A., y Sant, A. J. (2012). The Utility and Limitations of Current Web-Available Algorithms To Predict Peptides Recognized by CD4 T Cells in Response to Pathogen Infection. *The Journal of Immunology*, 188(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103640>
- Choi, J. C., Shin, J. W., Kim, J. Y., Park, I. W., Choi, B. W., y Lee, M. K. (2008). The effect of previous tuberculin skin test on the follow-up examination of whole-blood interferon- γ assay in the screening for latent tuberculosis infection. *Chest*, 133(6), 1415–1420. <https://doi.org/10.1378/chest.07-2193>
- Coady, A., y Sil, A. (2015). MyD88-dependent signaling drives host survival and early cytokine production during *Histoplasma capsulatum* infection. *Infection and Immunity*, 83(4), 1265–1275. <https://doi.org/10.1128/IAI.02619-14>
- Colombo, A. L., Tobón, A., Restrepo, A., Queiroz-Telles, F., y Nucci, M. (2011). Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology*. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.577821>
- Cong, H., Mui, E. J., Witola, W. H., Sidney, J., Alexander, J., Sette, A., ... McLeod, R. (2011). Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. *Vaccine*, 29(4), 754–762. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.015>
- Cottle, L. E., Gkrania-Klotsas, E., Williams, H. J., Brindle, H. E., Carmichael, A. J., Fry, G., y Beeching, N. J. (2013). A multinational outbreak of histoplasmosis following a biology field trip in the Ugandan rainforest. *Journal of Travel Medicine*, 20(2), 83–87. <https://doi.org/10.1111/jtm.12012>
- Dammermann, W., Bentzien, F., Stiel, E. M., Kühne, C., Ullrich, S., zur Wiesch, J. S., y Lüth, S. (2015). Development of a novel IGRA assay to test T cell responsiveness to HBV antigens in whole blood of chronic Hepatitis B patients. *Journal of Translational Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0513-1>
- Darling, S. T. (1908). Histoplasmosis: A Fatal Infectious Disease Resembling Kala-Azar Found Among Natives of Tropical America. *Archives of Internal Medicine*, 2(2), 107–123. <https://doi.org/10.1001/archinte.1908.00050070002001>
- Deepe Jr., G. S., y McGuinness, M. (2006). Interleukin-1 and host control of pulmonary histoplasmosis. *J Infect Dis*, 194(6), 855–864. <https://doi.org/10.1086/506946>
- Deepe, G. S., y Durose, G. G. (1995). Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity*, 63(8), 3151–3157.

- Deepe, George S. (2014). *Histoplasma capsulatum* (Histoplasmosis). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Vol. 2, pp. 2949–2962). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00265-4>
- Deepe, George S, y Gibbons, R. (2001). Protective Efficacy of H Antigen from *Histoplasma capsulatum* in a Murine Model of Pulmonary Histoplasmosis. *Infection and Immunity*, 69(5), 3128–3134. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3128>
- Deepe, George S, y Gibbons, R. S. (2009). Interleukins 17 and 23 influence the host response to *Histoplasma capsulatum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(1), 142–151. <https://doi.org/10.1086/599333>
- del Corral, H., Paris, S. C., Marin, N. D., Marin, D. M., Lopez, L., Henao, H. M., ... Garcia, L. F. (2009). IFN γ response to *Mycobacterium tuberculosis*, risk of infection and disease in household contacts of tuberculosis patients in Colombia. *PLoS One*, 4(12), e8257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008257>
- Díaz G., C. (2008). Mecanismos de Acción de los Fármacos Inmunosupresores. *Revista Chilena de Reumatología*, 24(2), 73–88.
- Dominguez, M. R., Silveira, E. L. V, de Vasconcelos, J. R. C., de Alencar, B. C. G., Machado, A. V, Bruna-Romero, O., ... Rodrigues, M. M. (2011). Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PloS One*, 6(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022011>
- Dunlap, N. E., Bass, J., Fujiwara, P., Hopewell, P., Horsburgh, C. R., Salfinger, M., y Simone, P. M. (2000). Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.16141>
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., y Raviglione, M. C. (1999). Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama*, 282(7), 677–686. <https://doi.org/10.1001/jama.282.7.677>
- Edwards, J. A., Alore, E. A., y Rappleye, C. A. (2011). The yeast-phase virulence requirement for α -glucan synthase differs among *histoplasma capsulatum* chemotypes. *Eukaryotic Cell*, 10(1), 87–97. <https://doi.org/10.1128/EC.00214-10>
- Edwards, J. A., Chen, C., Kemski, M. M., Hu, J., Mitchell, T. K., y Rappleye, C. A. (2013). *Histoplasma* yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. *BMC Genomics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-695>
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., y von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 1005–1016. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3903>

- Emmons CW. (1949). Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. *Public Health Rep.*, 64(28), 892–896. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1932.01950130232022>
- Eum, S. Y., Lee, Y. J., Kwak, H. K., Min, J. H., Hwang, S. H., Via, L. E., ... Cho, S. N. (2008). Evaluation of the diagnostic utility of a whole-blood interferon- γ assay for determining the risk of exposure to *Mycobacterium tuberculosis* in Bacille Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated individuals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61(2), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.01.002>
- Ewer, K., Millington, K. A., Deeks, J. J., Alvarez, L., Bryant, G., y Lalvani, A. (2006). Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(7), 831–839. <https://doi.org/10.1164/rccm.200511-1783OC>
- Fernandez-Andreu, C. M., Cadre-Raton, A. M., Maciín, G. M., Hernandez, A. L., y Hernandez, M. S. (1994). Relación entre la prueba intradérmica de histoplasmina y los niveles de anticuerpos detectables por ELISA e inmunodifusión. *Rev. Ins. Med.Trop. São Paulo*, 36 (1), 83–87.
- Fojtasek, M. F., Sherman, M. R., Garringer, T., Blair, R., Wheat, L. J., y Schnizlein-Bick, C. T. (1993). Local immunity in lung-associated lymph nodes in a murine model of pulmonary histoplasmosis. *Infection and Immunity*, 61(11), 4607–4614.
- Gascón, J., Torres, J. M., Jiménez, M., Mejias, T., Triviño, L., Gobbi, F., ... Corachan, M. (2005). Histoplasmosis infection in Spanish travelers to Latin America. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(12), 839–841. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-0050-6>
- Getahun, H., Matteelli, A., Chaisson, R. E., y Raviglione, M. (2015). Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *New England Journal of Medicine*, 372(22), 2127–2135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1405427>
- Gidwani, K., Jones, S., Kumar, R., Boelaert, M., y Sundar, S. (2011). Interferon-Gamma release assay (modified quantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001042>
- Gildea, L. A., Ciralo, G. M., Morris, R. E., y Newman, S. L. (2005). Human dendritic cell activity against *Histoplasma capsulatum* is mediated via phagolysosomal fusion. *Infection and Immunity*, 73(10), 6803–6811. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6803-6811.2005>
- Giulieri, S., y Manuel, O. (2011). QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. <https://doi.org/10.1586/erm.10.109>

- Gómez, A. M., Rhodes, J. C., y Deepe, G. S. (1991). Antigenicity and immunogenicity of an extract from the cell wall and cell membrane of *Histoplasma capsulatum* yeast cells. *Infection and Immunity*, 59(1), 330–336.
- Gomez, F. J., Allendoerfer, R., y Deepe Jr, G. S. (1995). Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. *Infection and Immunity*, 63(7), 2587. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=7911197207696073954related:4mTJ8PE3ym0J%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173347/pdf/632587.pdf
- Gomez, F. J., Gomez, A. M., y Deepe, G. S. (1992). An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice. *Infection and Immunity*, 60(7), 2565–2571. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=257204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gómez, L. F., Torres, I. P., Jiménez, M. D. P., McEwen, J. G., de Bedout, C., Peláez, C. A., ... Arango, M. (2018a). Detection of *Histoplasma capsulatum* in Organic Fertilizers by Hc100 Nested Polymerase Chain Reaction and Its Correlation with the Physicochemical and Microbiological Characteristics of the Samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1–20. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0214>
- Gómez, L. F., Torres, I. P., Jiménez, M. D. P., McEwen, J. G., de Bedout, C., Peláez, C. A., ... Arango, M. (2018b). Detection of *Histoplasma capsulatum* in Organic Fertilizers by Hc100 Nested Polymerase Chain Reaction and Its Correlation with the Physicochemical and Microbiological Characteristics of the Samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0214>
- Goodwin, R. A., Loyd, J. E., y Des Prez, R. M. (1981). Histoplasmosis in normal hosts. *Medicine (United States)*, 60(4), 231–266. <https://doi.org/10.1097/00005792-198107000-00001>
- Gourraud, P. A., Khankhanian, P., Cereb, N., Yang, S. Y., Feolo, M., Maiers, M., ... Oksenberg, J. (2014). HLA diversity in the 1000 genomes dataset. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097282>
- Green, J. H., Harrell, W. K., Gray, S. B., Johnson, J. E., Bolin, R. C., Gross, H., y Malcolm, G. B. (1976). H and M antigens of *Histoplasma capsulatum*: preparation of antisera and location of these antigens in yeast-phase cells. *Infect Immun*, 14(3), 826–831. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=965099
- Guedes, H. L. D. M., Guimarães, A. J., Muniz, M. D. M., Pizzini, C. V., Hamilton, A. J., Peralta, J. M., ... Zancopé-Oliveira, R. M. (2003). PCR assay for identification of

- histoplasma capsulatum based on the nucleotide sequence of the M antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 535–539. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.535>
- Guimaraes, A. J., Frases, S., Gomez, F. J., Zancopé-Oliveira, R. M., y Nosanchuk, J. D. (2009). Monoclonal antibodies to heat shock protein 60 alter the pathogenesis of histoplasma capsulatum. *Infection and Immunity*, 77, 1357–1367. <https://doi.org/10.1128/IAI.01443-08>
- Guimarães, Allan J., Martinez, L. R., y Nosanchuk, J. D. (2011). Passive administration of monoclonal antibodies against H. capsulatum and others fungal pathogens. *Journal of Visualized Experiments*, (48), 1–6. <https://doi.org/10.3791/2532>
- Guimarães, Allan Jefferson, Hamilton, A. J., de M. Guedes, H. L., Nosanchuk, J. D., y Zancopé-Oliveira, R. M. (2008). Biological function and molecular mapping of M antigen in yeast phase of Histoplasma capsulatum. *PLoS ONE*, 3(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003449>
- Guimarães, Allan Jefferson, Nosanchuk, J. D., y Maria, Z.-O. R. (2006). Diagnosis of Histoplasmosis. *Braz J Microbiol.*, 37(1), 1–13.
- Guimarães, Allan Jefferson, Pizzini, C. V., De Matos Guedes, H. L., Albuquerque, P. C., Peralta, J. M., Hamilton, A. J., y Zancopé-Oliveira, R. M. (2004). ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *Journal of Medical Microbiology*, 53(6), 509–514. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05469-0>
- Habich, C., Kempe, K., Gomez, F. J., Lillicrap, M., Gaston, H., van der Zee, R., ... Burkart, V. (2006). Heat shock protein 60: identification of specific epitopes for binding to primary macrophages. *FEBS Letters*, 580(1), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.060>
- Hage, C. A., Azar, M. M., Bahr, N., Loyd, J., y Wheat, L. J. (2015). Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36(5), 729–745. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562899>
- Hage, C. A., Davis, T. E., Fuller, D., Egan, L., Witt, J. R., Wheat, L. J., y Knox, K. S. (2010). Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in BAL fluid. *Chest*, 137(3), 623–628. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1702>
- Hamilton, A. J., Bartholomew, M. A., Figueroa, J., Fenelon, L. E., y Hay, R. J. (1990). Evidence that the m antigen of histoplasma capsulatum var. Capsulatum is a catalase which exhibits Cross-reactivity with other dimorphic fungi. *Medical Mycology*, 28(6), 479–485. <https://doi.org/10.1080/02681219080000601>
- Harris, J. E., y Deepe, G. S. (1988). Characterization of antigenic determinants in histoplasmin that stimulate Histoplasma capsulatum-reactive T cells in vitro. *Infection and Immunity*, 56(9), 2343–2349.

- Hill, P. C., Brookes, R. H., Fox, A., Jackson-Sillah, D., Jeffries, D. J., Lugos, M. D., ... McAdam, K. P. (2007). Longitudinal assessment of an ELISPOT test for Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS Medicine*, 4(6), 1061–1070. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040192>
- Hober, D., Benyoucef, S., Chehadeh, W., De, G. D., De X, L. T., Mouton, Y., y Wattre, P. (2000). Ex vivo interferon-gamma response to human immunodeficiency virus-1 derived peptides in human immunodeficiency virus-1 infected patients. *Scand.J Immunol.*, 51(0300-9475 (Print)), 429–433.
- Holbrook, E. D., Kemski, M. M., Richer, S. M., Wheat, L. J., y Rappleye, C. a. (2014). Glycosylation and immunoreactivity of the Histoplasma capsulatum Cfp4 yeast-phase exoantigen. *Infection and Immunity*, 82(10), 4414–4425. <https://doi.org/10.1128/IAI.01893-14>
- Holbrook, E. D., y Rappleye, C. A. (2008). Histoplasma capsulatum pathogenesis: making a lifestyle switch. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.010>
- Horwath, M. C., Fecher, R. A., y Deepe, G. S. (2015). Histoplasma capsulatum, lung infection and immunity. *Future Microbiology*, 10, 967–975. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.25>
- Jensen, K. K., Andreatta, M., Marcatili, P., Buus, S., Greenbaum, J. A., Yan, Z., ... Nielsen, M. (2018). Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*, 154(3). <https://doi.org/10.1111/imm.12889>
- Jiménez, R. A., Urán, M. E., de Bedout, C., Arango, M., Tobón, A. M., Cano, L. E., y Restrepo, A. (2002). Outbreak of acute histoplasmosis in a family group: identification of the infection source. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 22(2). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1154>
- Johnson, C. H., Klotz, M. G., York, J. L., Kruft, V., y McEwen, J. E. (2002). Redundancy, phylogeny and differential expression of Histoplasma capsulatum catalases. *Microbiology*, 148(4), 1129–1142. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1129>
- Kasuga, T., White, T. J., Koenig, G., Mcewen, J., Restrepo, A., Castañeda, E., ... Taylor, J. W. (2003). Phylogeography of the fungal pathogen Histoplasma capsulatum. *Molecular Ecology*, 12(12), 3383–3401. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x>
- Kauffman, C. A., Freifeld, A. G., Andes, D. R., Baddley, J. W., Herwaldt, L., Walker, R. C., ... Pappas, P. G. (2014). Endemic fungal infections in solid organ and hematopoietic cell transplant recipients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transplant Infectious Disease*, 16(2), 213–224. <https://doi.org/10.1111/tid.12186>

- Kauffman, C.. (2007). Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-06>
- Kauffman, C. A. (2009). Histoplasmosis. *Clinics in Chest Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2009.02.002>
- Kro, G., Asberg, A., Rollag, H., y Muller, F. (2017). Higher degree of CMV reactivation in CMV R+/IGRA-than R+/IGRA+ renal transplant recipients. *Transplant International*, 30(Supplement 2), 88–89. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/tri.13051>
- Kroetz, D. N., y Deepe, G. S. (2012). The role of cytokines and chemokines in Histoplasma capsulatum infection. *Cytokine*, 58(1), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.430>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., y Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kurita, N., Terao, K., Brummer, E., Ito, E., Nishimura, K., y Miyaji, M. (1991). Resistance of Histoplasma capsulatum to killing by human neutrophils - Evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products. *Mycopathologia*, 115(3), 207–213. <https://doi.org/10.1007/BF00462229>
- Kwon-Chung, K. J. (1972). Sexual stage of Histoplasma capsulatum. *Science (New York, N.Y.)*, 175(19), 326. <https://doi.org/10.1126/science.175.4019.326>
- Lalvani, A. (2007). Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: New tools to tackle an old enemy. *Chest*, 131(6), 1898–1906. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2471>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lee, J. H., Slifman, N. R., Gershon, S. K., Edwards, E. T., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., ... Braun, M. M. (2002). Life-threatening histoplasmosis complicating immunotherapy with tumor necrosis factor α antagonists infliximab and etanercept. *Arthritis and Rheumatism*, 46(10), 2565–2570. <https://doi.org/10.1002/art.10583>
- Lee, P. P., y Lau, Y. L. (2017). Cellular and molecular defects underlying invasive fungal infections-revelations from endemic mycoses. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00735>
- Lochmanova, A., Lochman, I., Tomaskova, H., Marsalkova, P., Raszka, J., Mrazek, J., ... Brozmanova, H. (2010). Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*, 42(9), 3574–3577. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.07.101>

- Long, K. H., Gomez, F. J., Morris, R. E., y Newman, S. L. (2003). Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(1), 487–494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496435>
- Losi, M., Knights, A. J., Mariani, F., Altieri, A. M., Paone, G., Loxton, A. G., ... Amicosante, M. (2016). QuantiFERON-TB performance enhanced by novel *Mycobacterium tuberculosis* specific antigens. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/13993003.01015-2015>
- Mack, U., Migliori, G. B., Sester, M., Rieder, H. L., Ehlers, S., Goletti, D., ... Lange, C. (2009). LTBI: Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. In *European Respiratory Journal* (pp. 956–973). <https://doi.org/10.1183/09031936.00120908>
- Marín, N. D., París, S. C., Rojas, M., y García, L. F. (2012). Reduced frequency of memory T cells and increased Th17 responses in patients with active tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(10), 1667–1676. <https://doi.org/10.1128/CVI.00390-12>
- Markowitz, H. (1967). Antibodies in Histoplasmosis, 93(1), 40–46.
- Mayfield, J. A., y Rine, J. (2007). The genetic basis of variation in susceptibility to infection with *Histoplasma capsulatum* in the mouse. *Genes and Immunity*, 8(6), 468–474. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364411>
- Mazurek, G. H., Jereb, J., Lobue, P., Iademarco, M. F., Metchock, B., y Vernon, A. (2005). Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*, 54(RR-15), 49–55.
- Mazurek, G. H., y Villarino, M. E. (2003). Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports / Centers for Disease Control*, 52(RR-2), 15–18.
- McKinsey, D. S., Spiegel, R. A., Hutwagner, L., Stanford, J., Driks, M. R., Brewer, J., ... Dall, L. (1997). Prospective study of histoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: incidence, risk factors, and pathophysiology. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24(6), 1195–1203. <https://doi.org/10.1086/513653>
- Medeiros, A. I., Bonato, V. L. D., Malheiro, A., Dias, A. R. V., Silva, C. L., y Faccioli, L. H. (2002). *Histoplasma capsulatum* inhibits apoptosis and Mac-1 expression in leucocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 56(4), 392–398. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01142.x>

- Menzies, D. (1999). Interpretation of repeated tuberculin tests: Boosting, conversion, and reversion. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.1.9801120>
- Messina, F. A., Marin, E., Caceres, D. H., Romero, M., Depardo, R., Priarone, M. M., ... Santiso, G. (2020). Coronavirus disease 2019 (Covid-19) in a patient with disseminated histoplasmosis and hiv—a case report from argentina and literature review. *Journal of Fungi*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040275>
- Mittal, J., Ponce, M. G., Gendlina, I., y Nosanchuk, J. D. (2019). Histoplasma capsulatum: Mechanisms for pathogenesis. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 422). https://doi.org/10.1007/82_2018_114
- Morgan, J., Cano, M. V., Feikin, D. R., Phelan, M., Monroy, O. V., Morales, P. K., ... Hajjeh, R. A. (2003). A large outbreak of histoplasmosis among American travelers associated with a hotel in Acapulco, Mexico, spring 2001. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(6), 663–669.
- Muraille, E., Leo, O., y Moser, M. (2014). Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603>
- Nagai, H., Suzukawa, M., Sakakibara, Y., Ohta, K., Reche, P. A., Suzuki, K., y Hoshino, Y. (2014). Immunological Responses and Epitope Mapping by Tuberculosis-Associated Antigens within the RD1 Region in Japanese Patients, 2014.
- Nanjappa, S. G., Heninger, E., Wüthrich, M., Gasper, D. J., y Klein, B. S. (2012). Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4+ T cells. *PLoS Pathogens*, 8(7), 24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002771>
- Negróni, R., De Flores, C. I., y Robles, A. M. (1976). [Study of serologic cross reactions between the antigens of Paracoccidioides brasiliensis and Histoplasma capsulatum]. *Rev Asoc Argent Microbiol*, 8(2), 68–73.
- Nel, J. S., Bartelt, L. A., van Duin, D., y Lachiewicz, A. M. (2018). Endemic Mycoses in Solid Organ Transplant Recipients. *Infectious Disease Clinics of North America*, 32(3), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.04.007>
- Newman, S. L., Gootee, L., y Gabay, J. E. (1993). Human neutrophil-mediated fungistasis against Histoplasma capsulatum: Localization of fungistatic activity to the azurophil granules. *Journal of Clinical Investigation*, 92(2), 624–631. <https://doi.org/10.1172/JCI116630>
- Newman, S. L., Gootee, L., Gabay, J. E., y Selsted, M. E. (2000). Identification of constituents of human neutrophil azurophil granules that mediate fungistasis against Histoplasma capsulatum. *Infection and Immunity*, 68(10), 5668–5672. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5668-5672.2000>

- Nielsen, M., y Andreatta, M. (2016). NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0288-x>
- Nosanchuk, J. (2005). Protective Antibodies and Endemic Dimorphic Fungi. *Current Molecular Medicine*, 5(4), 435–442. <https://doi.org/10.2174/1566524054022530>
- Nosanchuk, J. D., Zancopé-Oliveira, R. M., Hamilton, A. J., y Guimaraes, A. J. (2012). Antibody therapy for histoplasmosis. *Frontiers in Fungi and Their Interactions*, 3(February), 21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00021>
- Ohno, H., Ogata, Y., Suguro, H., Yokota, S., Watanabe, A., Kamei, K., ... Miyazaki, Y. (2010). An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 49(5), 491–495. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.49.2759>
- Olson, T. C., Bongartz, T., Crowson, C. S., Roberts, G. D., Orenstein, R., y Matteson, E. L. (2011). Histoplasmosis infection in patients with rheumatoid arthritis, 1998–2009. *BMC Infectious Diseases*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-145>
- Ordóñez, N., Tobón, A., Arango, M., Tabares, A., De Bedout, C., Gómez, B., ... Restrepo, A. (1997). Brotes de histoplasmosis registrados en el área andina colombiana. *Biomédica*, 17(2), 105. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v17i2.941>
- Pai, M., Joshi, R., Dogra, S., Mendiratta, D. K., Narang, P., Kalantri, S., ... Menzies, D. (2006). Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon-gamma assay. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(3), 349–355. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-472OC>
- Pai, M., Joshi, R., Dogra, S., Zwerling, A. A., Gajalakshmi, D., Goswami, K., ... Hopewell, P. C. (2009). T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(1), 84–92.
- Patel, A. A., Swerlick, R. A., y McCall, C. O. (2006). Azathioprine in dermatology: The past, the present, and the future. *Journal of the American Academy of Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.07.059>
- Patel, M., Lu, F., Hannaway, M., y Hochman, K. (2015). Fibrosing mediastinitis: a rare complication of histoplasmosis. *BMJ Case Reports*, 2015. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-212774>
- Pauw, B. De, Walsh, T. J., Donnelly, J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T., ... Bennett, J. E. (2008). Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious

- Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) C. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 1813–1821. <https://doi.org/10.1086/588660>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Petruccioli, E., Chiacchio, T., Pepponi, I., Vanini, V., Urso, R., Cuzzi, G., ... Goletti, D. (2016). First characterization of the CD4 and CD8 T-cell responses to QuantiFERON-TB Plus. *Journal of Infection*, 73(6), 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.09.008>
- Pieterman, E. D., Liqui Lung, F. G., Verbon, A., Bax, H. I., Ang, C. W., Berkhout, J., ... de Steenwinkel, J. E. M. (2018). A multicentre verification study of the QuantiFERON®-TB Gold Plus assay. *Tuberculosis*, 108(September 2017), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.11.014>
- Queiroz-Telles, F., Fahal, A. H., Falci, D. R., Caceres, D. H., Chiller, T., y Pasqualotto, A. C. (2017). Neglected endemic mycoses. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(11), e367–e377. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7)
- Ray, S. C., y Rappleye, C. A. (2018). Flying under the radar: *Histoplasma capsulatum* avoidance of innate immune recognition. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.009>
- Reeves, M. W., Pine, L., Kaufman, L., y McLaughlin, D. (1972). Isolation of a new soluble antigen from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. *Applied Microbiology*, 24(5), 841–843. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=380675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rodrigues, L. C., Secatto, A., Sorgi, C. A., Dejadi, N. N., Medeiros, A. I., Prado, M. K. B., ... Dias-Baruffi, M. (2016). Protective Effect of Galectin-1 during *Histoplasma capsulatum* Infection Is Associated with Prostaglandin E2 and Nitric Oxide Modulation. *Mediators of Inflammation*, 2016, 5813794. <https://doi.org/10.1155/2016/5813794>
- Rubio-Carrasquilla, M., Ochoa, R., Santa, C., Guimarães, A. J., Cano, L. E., y Moreno, E. (2019). Identifying molecularly defined antigens for a *Histoplasma capsulatum*-specific interferon gamma release assay. *Revista Iberoamericana de Micología*, 36(4). <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.06.002>
- Rubio-Carrasquilla, M., Santa, C. D., Rendón, J. P., Botero-Garcés, J., Guimarães, A. J., Moreno, E., y Cano, L. E. (2019). An interferon gamma release assay specific for *Histoplasma capsulatum* to detect asymptomatic infected individuals: A proof of concept study. *Medical Mycology*, 57(6). <https://doi.org/10.1093/mmy/myy131>
- Rutledge, T. F., Boyd, M. F., Mazurek, M., Jereb, J., Vernon, A., LoBue, P., ... Cdc, C. for D. C. and P. (2010). Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 2010.

- MMWR Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports / Centers for Disease Control, 59(RR-5), 1–25. <https://doi.org/rr5415a4> [pii]
- Sá-Nunes, A., Medeiros, A. I., Nicolete, R., Frantz, F. G., Panunto-Castelo, A., Silva, C. L., y Faccioli, L. H. (2005). Efficacy of cell-free antigens in evaluating cell immunity and inducing protection in a murine model of histoplasmosis. *Microbes and Infection*, 7(4), 584–592. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.12.017>
- Saldan, A., Forner, G., Mengoli, C., Tinto, D., Fallico, L., Peracchi, M., ... Abate, D. (2016). Comparison of the cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and cmv quantiFERON cell-mediated immune assays in CMV-seropositive and -seronegative pregnant and nonpregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5), 1376–1380. <https://doi.org/10.1128/JCM.03128-15>
- Salomon, J., Flament Saillour, M., De Truchis, P., Bougnoux, M. E., Dromer, F., Dupont, B., ... Perronne, C. (2003). An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis in members of a trekking trip in Martinique, French West Indies. *J Travel Med*, 10(2), 87–93. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12650650
- Salvin, S. B. (1959). Current concepts of diagnostic serology and skin hypersensitivity in the mycoses. *The American Journal of Medicine*, 27(1), 97–114. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(59\)90064-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(59)90064-6)
- Sathapatayavongs, B., Batteiger, B. E., Wheat, J., Slama, T. G., y Wass, J. L. (1983). Clinical and laboratory features of disseminated histoplasmosis during two large urban outbreaks. *Medicine (Baltimore)*, 62(5), 263–270. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6312246>
- Scheel, C. M., Samayoa, B., Herrera, A., Lindsley, M. D., Benjamin, L., Reed, Y., ... Gomez, B. L. (2009). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients. *Clin Vaccine Immunol*, 16(6), 852–858. <https://doi.org/CVI.00066-09> [pii]r10.1128/CVI.00066-09
- Scully, M. C., y Baddley, J. W. (2018). Epidemiology of Histoplasmosis. *Current Fungal Infection Reports*, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0309-x>
- Segel, M. J., Rozenman, J., Lindsley, M. D., Lachish, T., Berkman, N., Neuberger, A., y Schwartz, E. (2015). Histoplasmosis in Israeli travelers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(6), 1168–1172. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0509>
- Sepúlveda, V. E., Márquez, R., Turissini, D. A., Goldman, W. E., y Matute, D. R. (2017). Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. *MBio*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01339-17>

- Sester, M., Sotgiu, G., Lange, C., Giehl, C., Girardi, E., Migliori, G. B., ... Manissero, D. (2011). Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 37(1), 100–111. <https://doi.org/10.1183/09031936.00114810>
- Shar L. Waldrop, Christine J. Pitcher, Dolores M. Peterson, Vernon C. Maino, y L. J. P. (1997). Determination of Antigen-specific Memory / Effector CD4 + T Cell Frequencies by Flow Cytometry. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(7), 1739–1750.
- Shi, L., Albuquerque, P. C., Lazar-Molnar, E., Wang, X., Santambrogio, L., Gácsér, A., y Nosanchuk, J. D. (2008). A monoclonal antibody to *Histoplasma capsulatum* alters the intracellular fate of the fungus in murine macrophages. *Eukaryotic Cell*, 7(7), 1109–1117. <https://doi.org/10.1128/EC.00036-08>
- Sifuentes-Osornio, J., Corzo-León, D. E., y Ponce-De-León, L. A. (2012). Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*, 6, 23–34. <https://doi.org/10.1007/s12281-011-0081-7>
- Smith, J. G., Liu, X., Kaufhold, R. M., Clair, J., y Caulfield, M. J. (2001). Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.871-879.2001>
- Tagmouti, S., Slater, M., Benedetti, A., Kik, S. V., Banaei, N., Cattamanchi, A., ... Denkinger, C. (2014). Reproducibility of interferon gamma (IFN- γ) release assays a systematic review. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(8), 1267–1276. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201405-188OC>
- Taylor, A. L., Watson, C. J. E., y Bradley, J. A. (2005). Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 56(1 SPEC. ISS.), 23–46. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.03.012>
- Teixeira, M. de M., Patané, J. S. L., Taylor, M. L., Gómez, B. L., Theodoro, R. C., de Hoog, S., ... Barker, B. M. (2016). Worldwide Phylogenetic Distributions and Population Dynamics of the Genus *Histoplasma*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004732>
- Tenenberg, D. J., y Arden Howell. (1948). COMPLEMENT FIXATION TEST FOR HISTOPLASMOSIS. *Public Health Reports*, 63(6), 163–199.
- Tobon, A. M., Agudelo, C. A., Rosero, D. S., Ochoa, J. E., Bedout, C., Zuluaga, A., ... Am, J. T. M. H. (2005). Disseminated histoplasmosis: a comparative study between patients with acquired immunodeficiency syndrome and non-human immunodeficiency virus-infected individuals. *Am J Trop Med Hyg*, 73(3), 576–582. <https://doi.org/73/3/576> [pii]

- Toyotome, T., Watanabe, A., Ochiai, E., y Kamei, K. (2015). N-acetylated α -linked acidic dipeptidase is identified as an antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 483–487. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.129>
- Travassos, L. R., y Taborda, C. P. (2017). Linear epitopes of *Paracoccidioides brasiliensis* and other fungal agents of human systemic mycoses as vaccine candidates. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00224>
- Tsiodras, S., Samonis, G., Boumpas, D. T., y Kontoyiannis, D. P. (2008). Fungal infections complicating tumor necrosis factor alpha blockade therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. *Mayo Clinic*, 83(2), 181–194. <https://doi.org/10.4065/83.2.181>
- Turgay, N., Balcioglu, I. C., Toz, S. O., Ozbek, Y., y Jones, S. L. (2010). Short report: Quantiferon-Leishmania as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(4), 822–824. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0605>
- Vallabhaneni, S., y Chiller, T. M. (2016). Fungal Infections and New Biologic Therapies. *Current Rheumatology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11926-016-0572-1>
- Van Prooyen, N., Henderson, C. A., Hocking Murray, D., y Sil, A. (2016). CD103+ Conventional Dendritic Cells Are Critical for TLR7/9-Dependent Host Defense against *Histoplasma capsulatum*, an Endemic Fungal Pathogen of Humans. *PLoS Pathogens*, 12(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005749>
- Vergidis, P., Avery, R. K., Wheat, L. J., Dotson, J. L., Assi, M. A., Antoun, S. A., ... Hage, C. A. (2015). Histoplasmosis complicating tumor necrosis factor-alpha blocker therapy: a retrospective analysis of 98 cases. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 61(3), 409–417. <https://doi.org/10.1093/cid/civ299>
- Weir, R. E., Morgan, A. R., Britton, W. J., Butlin, C. R., y Dockrell, H. M. (1994). Development of a whole blood assay to measure T cell responses to leprosy: a new tool for immuno-epidemiological field studies of leprosy immunity. *Journal of Immunological Methods*, 176(1), 93–101. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90353-0)
- Wheat, J. (1995). Endemic mycoses in AIDS: A clinical review. *Clinical Microbiology Reviews*.
- Wheat, J., French, M. L. V., Kamel, S., y Tewari, R. P. (1986). Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(3), 493–499.
- Wheat, L. J. (1993). The role of the serologic diagnostic laboratory and the diagnosis of fungal disease. *Fungal Diseases of the Lung. 2d Ed. New York: Raven*, 29-38.

- Wheat, L. J. (2001). Laboratory diagnosis of histoplasmosis: Update 2000. *Seminars in Respiratory Infections*. <https://doi.org/10.1053/srin.2001.24243>
- Wheat, L. J., Azar, M. M., Bahr, N. C., Spec, A., Relich, R. F., y Hage, C. (2016). Histoplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 207–227. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.009>
- Whitworth, H. S., Scott, M., Connell, D. W., Dongés, B., y Lalvani, A. (2013). IGRAs - The gateway to T cell based TB diagnosis. *Methods*, 61(1), 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.12.012>
- Winters, M. S., Chan, Q., Caruso, J. A., y Deepe, G. S. (2010). Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(7), 1136–1145. <https://doi.org/10.1086/656191>
- Wood, P. R., Corner, L. A., y Plackett, P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Research in Veterinary Science*, 49(1), 46–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2116655>
- Woods, J. P. (2016). Revisiting old friends: Developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. *Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6044-5>
- Wu, S.-Y., Yu, J.-S., Liu, F.-T., Miaw, S.-C., y Wu-Hsieh, B. A. (2013). Galectin-3 Negatively Regulates Dendritic Cell Production of IL-23/IL-17-Axis Cytokines in Infection by *Histoplasma capsulatum*. *The Journal of Immunology*, 190(7), 3427–3437. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202122>
- Zámocký, M., y Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00058-3)
- Zancopé-Oliveira, R., Bragg, S. L., Hurst, S. F., Peralta, J. M., y Reiss, E. (1993). Evaluation of Cation Exchange Chromatography for the Isolation of M-glycoprotein from Histoplasmin. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 31, 29–41.
- Zancopé-Oliveira, R. M., Reiss, E., Lott, T. J., Mayer, L. W., Deepe, G. S. J., y Infect, I. (1999). Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*, 67(4), 1947–1953.