

Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en los murciélagos *Desmodus rotundus* (no migratorio) y *Tadarida brasiliensis* (migratorio de larga distancia): primeros registros en México

Catalina Beatriz Chávez-Tapia¹, Gabriela Peña-Sandoval², Gabriela Rodríguez-Arellanes²,
María del Rocío Reyes-Montes³, Esperanza Duarte-Escalante², María Lucía Taylor²

¹Laboratorio de Zoología, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF 54090, México
²Laboratorios de ²Inmunología de Hongos y de ³Micología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina, UNAM, México DF 04510, México

***Histoplasma capsulatum* isolation from *Desmodus rotundus* (non-migratory) and *Tadarida brasiliensis* (long distance migratory) bats: first recorded cases in Mexico**

Abstract. This study describes four isolates of *Histoplasma capsulatum*: one from the lung of *Desmodus rotundus* and three from the lung, liver, and intestine of *Tadarida brasiliensis*; all were considered the first recorded cases in Mexico of this pathogen, in these bat species. The fungal identification was confirmed throughout macro and micromorphology, exoantigens production and dimorphic transition. The isolates were characterized by RAPD-PCR. Based on the DNA polymorphism analyses, we suggest that *T. brasiliensis* was infected with the fungus outside Mexico.

Key words: *Histoplasma capsulatum*, bats, *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis*.

Resumen. Este trabajo refiere cuatro aislamientos de *Histoplasma capsulatum*: uno de pulmón de *Desmodus rotundus* y tres de pulmón, hígado e intestino de *Tadarida brasiliensis*, todos considerados como primer registro en México del patógeno, en estas especies de murciélagos. Se confirmó la identificación del hongo por macro y micromorfología, producción de exoantígenos y transición dimórfica. Los aislamientos se caracterizaron por RAPD-PCR. De acuerdo con el polimorfismo del DNA, se sugiere que *T. brasiliensis* fue infectado con el hongo fuera de México.

Palabras clave: *Histoplasma capsulatum*, murciélagos, *Desmodus rotundus*, *Tadarida brasiliensis*.

Received 18 January 2005; accepted 9 June 2005.

Recibido 18 de enero 2005; aceptado 9 de junio 2005.

Introducción

Los ambientes cavernícolas, con sus características bióticas y abióticas, conforman uno de los nichos ecológicos más apropiados para el patógeno fúngico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, Darling 1906 [5], agente etiológico de la micosis respiratoria denominada actualmente "histoplasmosis capsulati". En México, esta micosis es particularmente importante por su alta prevalencia en áreas rurales, donde existe una población de riesgo ocupacional

*Autor para correspondencia: María Lucía Taylor
emello@servidor.unam.mx*

relacionada a labores realizadas en recintos cerrados como cuevas, cavernas, grutas, minas y bocaminas [9, 30-35, 38, 39].

Existe una estrecha asociación entre los murciélagos y el hongo, debido a que *H. capsulatum* se desarrolla en el guano de estos animales, el cual es rico en nitrógeno y fósforo, elementos que favorecen el crecimiento de la fase micelial e infectiva del patógeno [37]. En consecuencia, *H. capsulatum* es capaz de infectar diferentes especies de mamíferos, particularmente, los de hábitos cavernícolas. Los murciélagos constituyen uno de los grupos de mamíferos de más amplia distribución en la naturaleza. Se conoce un gran número de

especies que varían en tamaño, hábitos alimentarios, reproductivos y migratorios y que utilizan refugios de varios tipos [2, 40]. En México, se han reportado cerca de 137 especies de murciélagos, 60 pueden ser consideradas como cavernícolas, 27 utilizan estos ambientes como refugio permanente y 33 como refugio alternativo [2, 17].

Desde hace varios años se ha documentado que los murciélagos pueden infectarse con *H. capsulatum* y en diferentes especies, se han informado porcentajes de infección que varían del 1 al 66% [3, 6, 16, 23, 24, 29]. En México, están registrados varios aislamientos del hongo a partir de: *Mormoops megalophylla*, *Myotis californicus*, *Pteronotus davyi* y *Leptonycteris curasoae* (primeros registros para el mundo), *Pteronotus parnellii*, *Natalus stramineus*, *Artibeus hirsutus*, *Leptonycteris nivalis* (primeros registros para México) [4, 29, 35]. Se ha propuesto que los murciélagos juegan un papel en la dispersión de *H. capsulatum* [11, 14]. Sin embargo, la dispersión del hongo por murciélagos infectados y/o enfermos, a otros sitios favorables para su crecimiento, ha sido mejor sostenida por los estudios de marcadores moleculares del hongo recuperado de animales capturados en diferentes sitios del país, como lo refieren Taylor *et al.* [27, 28]. Sin lugar a dudas, los hábitos coloniales de los murciélagos cavernícolas y su capacidad de vuelo son parámetros importantes para explicar la dispersión del patógeno fúngico [7, 28].

Estudios realizados en México con diferentes aislamientos de *H. capsulatum* provenientes de murciélagos infectados y capturados en distintos sitios de la República Mexicana, revelaron inicialmente dos patrones polimórficos de DNA por el método de RAPD-PCR con un sólo oligonucleótido, el primero integrado por aislamientos procedentes de murciélagos capturados en el estado de Guerrero y el segundo formado por aislamientos de murciélagos capturados en el estado de Morelos [4]. Para definir con mayor precisión estos patrones, se estudiaron aislamientos que procedían de murciélagos residentes junto

con otros obtenidos de murciélagos migratorios. Para tal fin, se utilizó una modificación del RAPD-PCR empleando doble oligonucleótido para amplificar el DNA genómico que tiene la ventaja de aumentar el polimorfismo genético. Los resultados revelaron un patrón monomórfico común para la mayoría de los aislamientos estudiados, por lo que este patrón de DNA fue propuesto como marcador fúngico para la infección de murciélagos y para definir las áreas geográficas de dispersión del hongo en México [27, 28].

Leptonycteris curasoae y *L. nivalis*, fueron propuestos como posibles dispersores del hongo en México, al identificar un patrón molecular idéntico del patógeno en áreas más extensas del país alcanzadas por ambas especies de *Leptonycteris*, como ha sido sugerido por Taylore *et al.* [28].

La distribución de *H. capsulatum* en la naturaleza asociada a aislamientos obtenidos a partir de murciélagos infectados podría ser empleada para mapear geográficamente el hongo, al utilizar su patrón polimórfico del DNA como marcador biológico y así rastrear a este patógeno a través de los desplazamientos habituales de los murciélagos migratorios. La biogeografía del polimorfismo de *H. capsulatum* recién utilizada para estudios de filogenia [12], puede también contribuir a resolver la polémica que existe con relación al alcance de las migraciones de especies de murciélagos. El presente trabajo tiene como objetivos: 1) registrar la infección por *H. capsulatum* en *Desmodus rotundus* y *Tadarida brasiliensis* capturados en México, ya que después de una revisión minuciosa, no se encontró ningún reporte sobre la infección natural de estos murciélagos por *H. capsulatum* en nuestro país [4, 15, 29]; y 2) actualizar los datos de la distribución del hongo en México, asociándolo a su dispersión en la naturaleza con base en los hallazgos moleculares.

Materiales y métodos

Animales

Se procesaron un total de 13 murciélagos, capturados al azar en la cueva “El Salitre”, Tlaltizapán, Morelos (MS) y en la cueva “Chica”, Río Seco, Oaxaca (OC), México. Se seleccionaron especímenes machos adultos, pertenecientes a diferentes especies no consideradas en peligro de extinción. Para su captura se colocaron redes de niebla a la entrada de las cuevas. Los especímenes fueron separados en bolsas especiales para su transporte al laboratorio, donde fueron procesados para la obtención de aislamientos fúngicos. Se determinó la especie y edad de los animales según Hall [10] y Wilson y Reeder [41], por personal especializado y con autorización de captura.

Extracción y procesamiento de muestras de órganos para aislamientos de *H. capsulatum*

Los murciélagos capturados fueron sacrificados y se tomaron muestras de órganos en condiciones de esterilidad (pulmón, intestino, hígado, bazo y tráquea), las cuales fueron lavadas con solución salina estéril adicionada con gentamicina. Cada muestra fue disgregada para aislamiento del patógeno, según lo descrito por Taylore *et al.* [29].

Testigos fúngicos

Se utilizaron seis aislamientos de *H. capsulatum* como testigos en los diferentes ensayos, dos recuperados de murciélagos infectados naturalmente y capturados en MS (EH-373 y EH-374), uno de un paciente mexicano con histoplasmosis diseminada y residente en el estado de MS (EH-317), una cepa de referencia procedente de Estados Unidos de América (EUA) obtenida de una histoplasmosis diseminada (G-217B) y gentilmente donada por el Dr. G S. Kobayashi, de la Universidad de Washington, St. Louis, MO, y además dos aislamientos clínicos (MZ) de Colombia (CO) y

(993444) de Argentina (AR), respectivamente. Estos aislamientos pertenecen a la “Colección de Cepas de *Histoplasma capsulatum*” del Laboratorio de Inmunología de Hongos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>). Todos los aislamientos se mantuvieron en fase micelial a 28°C en agar-micobiótico (Bioxón, México, DF) y en fase levaduriforme crecida a 37°C en caldo BHI (Bioxón) y crioconservada a -196°C en presencia de suero fetal de ternera (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island Biological Co., NY) y dimetilsulfóxido (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) en una relación 9:1.

Caracterización fenotípica

Identificación macroscópica. A partir de cultivos puros obtenidos por clonación de cada uno de los cuatro nuevos aislamientos procedentes de los órganos de los murciélagos procesados y además de los seis testigos utilizados, se hicieron siembras en agar-micobiótico. Se identificó la morfología colonial de cada aislamiento, considerando la pigmentación y el aspecto del micelio aéreo.

Identificación microscópica. Se prepararon microcultivos de cada aislamiento, para una mejor apreciación de la morfología microscópica. Todo el procedimiento se realizó en condiciones estrictas de esterilidad. Brevemente: se cortó un cuadro de agar-micobiótico y se colocó dentro de una caja con cámara húmeda de glicerol al 10%. Se sembró, por picadura, la fase micelial de los aislamientos en las cuatro caras laterales del cuadro de agar y se colocó un cubreobjetos sobre la parte superior del cuadro. Se incubó durante 2 a 4 semanas a 28°C. Posteriormente, se inactivó el cultivo con formaldehído al 10%, se eliminó el cuadro de agar y se montaron preparaciones utilizando las áreas de crecimiento fúngico en el cubre y portaobjetos, adicionando una gota de azul de algodón con lactofenol de Amman que permitió fijar y teñir el micelio. Las preparaciones se observaron en microscopio

Olympus BX50 (Olympus Optical, Japan) a 40 y 100 X para identificar las características morfológicas propias del patógeno.

Transición de la fase micelial a levaduriforme. La transición de micelio a levadura se llevó a cabo a 37°C partir de los cultivos puros. Se siguió el procedimiento descrito por Taylor *et al.* [29], utilizando medio sintético de Tewary y Kegel [36].

Producción de exoantígenos. Se siguió el método de Standard y Kaufman [26]. La fase micelial de los aislamientos se sembró en caldo BHI (Bioxón) y se incubó en baño María a 28°C con agitación durante 7-10 días. Cada cultivo se inactivó, con timerosal a una dilución final de 1:5000, durante 72 h. Se separó la masa micelial de cada cultivo, y se concentró el filtrado 50 veces, utilizando el sistema de Amicon (Amicon, Lexington, MA) con una membrana PM-10 con límite de exclusión de 10 kDa. Se dializó contra agua desionizada durante 24 h, haciendo varios cambios, obteniendo finalmente los exoantígenos concentrados, denominados histoplasminas crudas, para su posterior identificación antigénica. Ésta se llevó a cabo utilizando el método inmunológico de doble inmunodifusión en gel [18] y de acuerdo con lo descrito por Taylor *et al.* [35].

Caracterización genotípica

Extracción de DNA de *H. Capsulatum*. Se obtuvo la biomasa fúngica de la fase micelial de cada uno de los 10 aislamientos de *H. capsulatum* crecidos en el medio GYE (2% de glucosa y 1% de extracto de levadura) a 28°C, durante 4 semanas. La biomasa se cosechó por filtración según lo descrito por Reyes-Montes *et al.* [20]. Para confirmar la identidad inmunológica de cada biomasa, se realizaron pruebas de control inmunológico, utilizando la inmunodifusión en gel (IDG) con el filtrado de cultivo concentrado, originario de cada biomasa, frente a sueros

testigos positivos y negativos (voluntario sano). Sólo las biombras con filtrados capaces de desarrollar reacción de precipitación en IDG con el suero testigo positivo se utilizaron en la extracción de DNA. La extracción del DNA de cada uno de los aislamientos se realizó según Reyes-Montes *et al.* [20, 21]. El DNA se disolvió en agua grado milliQ y se determinó la concentración del mismo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, comparando 2 L de DNA de cada muestra con diluciones de 50, 100 y 150 ng/L del DNA del fago (GIBCO). Cada muestra se mezcló con 2 L de regulador de corrida 10X (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 25% y ficoll 400 25%) antes de colocarse en el gel de agarosa al 1%.

Amplificación al azar del DNA polimórfico por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). Se utilizó el método de RAPD-PCR empleando el doble iniciador de 10 nucleótidos 1281 (5'-AACGCGCAAC) y el 1283 (5'-GCGATCCCCA-3') (Operon Technologies, Alameda, CA.), los cuales fueron previamente probados para *H. capsulatum* por Kersulyte *et al.* [13] y Woodset *et al.* [42] y el procedimiento se desarrolló según Taylor *et al.* [27, 28]. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y revelados con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 g/ml, en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM). El gel se corrió a 70 V. Se utilizó el marcador de tamaño molecular estándar de 123 bp DNA Ladder (GIBCO). La imagen de los geles fue capturada con un fotodocumentador synoptics (Syngene, Cambridge) y se imprimió en una impresora térmica (SONY 650, Tokio).

Análisis de datos

A partir de los perfiles de los fragmentos de DNA amplificados por RAPD-PCR revelados en el gel de agarosa, se construyó una matriz de presencia y ausencia de bandas. Estos datos se procesaron para obtener un estimado de

similitud para cada par de aislamientos. La similitud se calculó por medio del coeficiente de Jaccard [19] y se obtuvo una matriz de similitud genética pareada entre los aislamientos. A partir de esta matriz, se construyó un dendrograma por medio del método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA). Se calculó el coeficiente de correlación cofenética [25] para determinar el grado de relación entre la matriz del dendrograma y la matriz de similitud original. Se estableció multidimensionalmente el ordenamiento de los aislamientos, por el análisis de árbol de tendido mínimo. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa NTSYS-PC versión 2.0 [22].

Resultados

Se capturaron murciélagos machos adultos, correspondientes a las especies: *Pteronotus parnellii* (1), *Artibeus hirsutus* (2), *Desmodus rotundus* (2), en la cueva "El Salitre"-MS y en la cueva "Chica"-OC se capturaron *Myotis* sp. (4), *Tadarida brasiliensis* (1), *Pteronotus parnellii* (1), *Macrotus waterhoussi* (1), *Artibeus jamaicensis* (1). Las especies de murciélagos con aislamiento positivo de *H. capsulatum*, fueron identificadas como *D. rotundus* y *T. brasiliensis* de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos y confirmado

con lo descrito en México por Medellín *et al.* [17]. Se obtuvieron cuatro aislamientos de *H. capsulatum*, uno de *D. rotundus* (pulmón) y tres de *T. brasiliensis* (pulmón, hígado e intestino) que constituyen los primeros registros en México de ambas especies de murciélagos. Los aislamientos del hongo fueron caracterizados inicialmente por la morfología colonial de la fase micelial en agar-micobiótico, descartando hongos y levaduras contaminantes. A partir de colonias puras de los aislamientos sospechosos se identificó el tipo "A", correspondiente a colonias albinas, con reverso pardo-claro y presentando un micelio aéreo corto filamentososo (Fig. 1a). El tiempo de crecimiento de las colonias fue tardío entre los 15-20 días. Microscópicamente se observó micelio delgado y septado con macroconidios que midieron de 8-14 µm de diámetro con pared celular gruesa y proyecciones digitiformes, también se observaron microconidios piriformes típicos de la especie (Fig. 1b). La identificación fue confirmada por la transición de la fase micelial a levaduriforme con un tiempo de 2-3 semanas. Se observaron las bandas H y M específicas del hongo en los ensayos de inmunodifusión en gel, al utilizar los exoantígenos obtenidos de cada uno de los aislamientos estudiados y suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* (Fig. 2). Los aislamientos fueron incorporados a la Colección de Cepas de *H. capsulatum* del Laboratorio de Inmunología de Hongos del

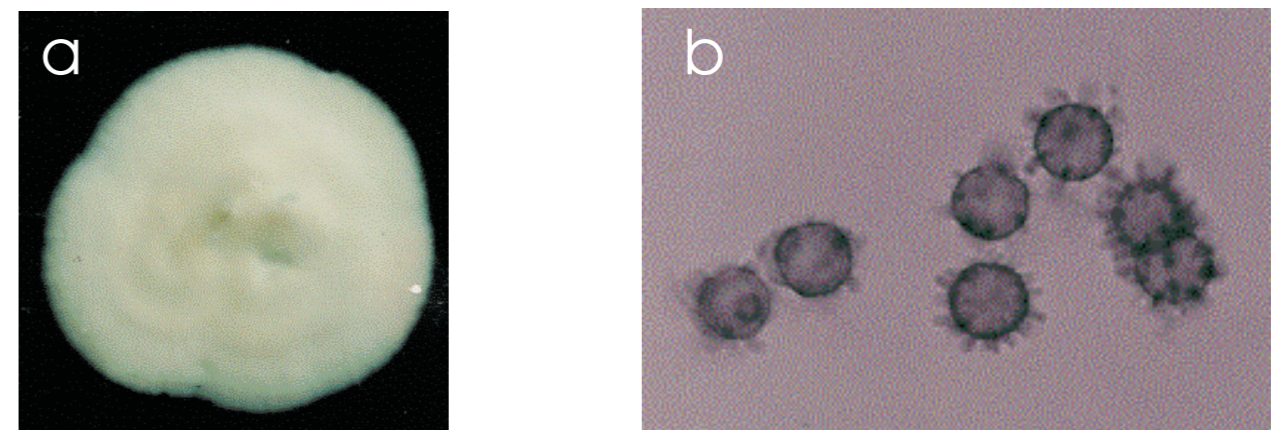


Fig. 1. Morfología colonial de los aislamientos de *H. capsulatum*. a) Aislamiento obtenido de pulmón de *D. rotundus* (EH-437P). b) Aislamiento obtenido de hígado de *T. brasiliensis* (EH-384H); se observan macroconidios con proyecciones digitiformes y pared celular gruesa 40X.

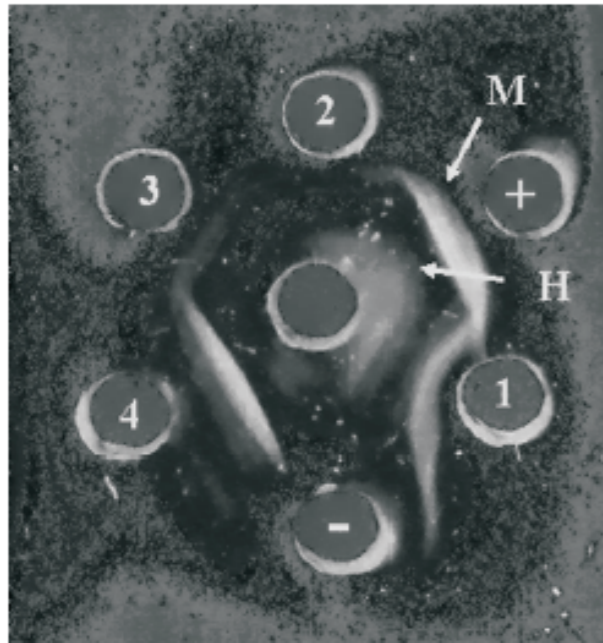


Fig. 2. Producción de exoantígenos de los aislamientos de *H. capsulatum* recuperados a partir de órganos de *T. brasiliensis* y de *D. rotundus*. Se obtuvieron exoantígenos por el método de Standard y Kaufman 26 y se probaron por doble inmunodifusión en gel. Exoantígenos: pozo 1 (EH-384P); pozo 2 (EH-384H); pozo 3 (EH-384I); pozo 4 (EH-437P). Se colocó en el pozo del centro el suero hiperinmune de conejo anti-*H. capsulatum* (S). Se utilizó como testigo positivo de antígeno, el obtenido de la cepa EH-53 (+) y solución salina como testigo negativo del exoantígeno (-). Las bandas cercanas a los pozos con exoantígenos son reconocidas como M y las cercanas al pozo del suero se consideran como H.

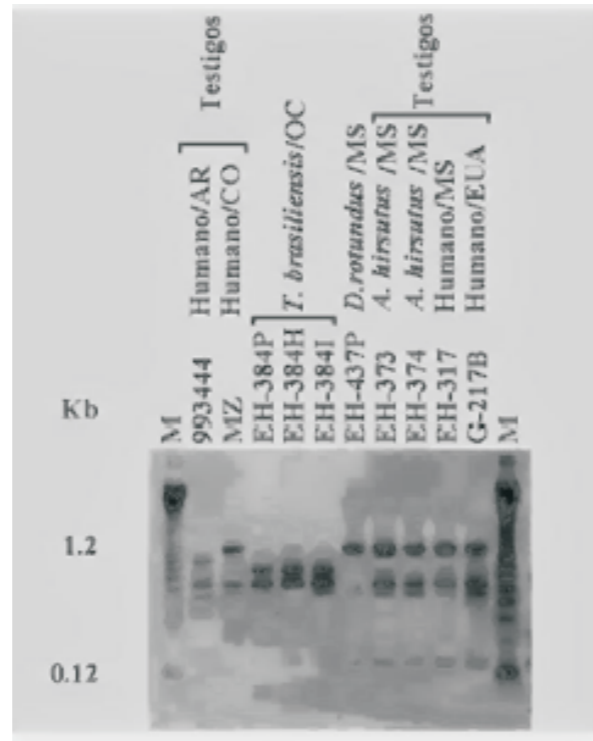


Fig. 3. Patrones RAPD-PCR de DNAs obtenidos de aislamientos de *H. capsulatum* de murciélagos infectados (*D. rotundus* y *T. brasiliensis*), comparados con aislamientos testigos. El RAPD-PCR fue realizado de acuerdo con las condiciones descritas en materiales y métodos. M- 123 bp DNA Ladder. AR- Argentina; CO- Colombia; OC- Oaxaca, MX; MS- Morelos, MX; EUA- Estados Unidos de América; MX- México.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM (<http://www.histoplas-mex.unam.mx>), con los números EH-384H, EH-384I, EH-384P para los de *T. brasiliensis* y con el número EH-437P para el de *D. rotundus*.

RAPD-PCR

El patrón polimórfico de todos los aislamientos, muestra que los de Morelos (EH-373, EH-374 y EH-317) e inclusive el de *D. rotundus* (EH-437P), está representado por 10 bandas comunes con variación en su intensidad que no difieren a pesar de que proceden de distintas fuentes, murciélagos y humanos infectados. La cepa de referencia G-217B muestra 11 bandas de las cuales comparte 10 bandas con el grupo anterior. El patrón polimórfico de los aislamientos del murciélago *T. brasiliensis* está representado por ocho bandas

y comparte cinco bandas con el aislamiento de un paciente colombiano que tiene seis bandas. Mientras que el polimorfismo del aislamiento procedente de un paciente argentino presentó un patrón disímil a los anteriores, representado por cinco bandas, de las cuales sólo tres son compartidas. En la figura 3, se observa el patrón de bandas que muestra la diversidad polimórfica de los aislamientos de *H. capsulatum* procedentes de murciélagos capturados en MS y OC y asimismo la observada en cepas de referencia de distintas zonas geográficas.

Se construyó una matriz de datos con los valores de Kb calculados para todas las bandas polimórficas reveladas en los perfiles de RAPD-PCR de los aislamientos y/o cepas estudiadas. Para la construcción de ésta se dieron valores arbitrarios de 1-0 a la presencia o ausencia de las bandas,

según lo referido en materiales y métodos. A partir de la matriz se analizaron los perfiles polimórficos de los DNAs que permitió calcular los promedios del coeficiente de similitud entre grupos de aislamientos y/o cepas, expresados en un dendrograma generado por UPGMA. La figura 4 muestra los coeficientes de similitud entre los 10 aislamientos y/o cepas estudiadas, los cuales se asociaron en tres grupos: El I, formado por dos subgrupos, el Ia que incluye los aislamientos de pulmón, hígado e intestino de *T. brasiliensis* que se relacionan entre sí en un coeficiente de similitud de 1.0 y el subgrupo Ib donde se ubican el aislamiento de *D. rotundus*, los aislamientos testigos de *H. capsulatum* procedentes de murciélagos *A. hirsutus* capturados en la cueva "El Salitre" y de humano residente en MS, relacionándose éstos con un coeficiente de similitud de 1.0, y además la cepa G-217B obtenida de un paciente de EUA que se relacionó con los aislamientos anteriores con un coeficiente de similitud de 0.98; El II incluye sólo el aislamiento de CO que se relaciona con el grupo I en un coeficiente de similitud de 0.58; finalmente, el III también incluyó sólo un aislamiento clínico, el de AR, que se relaciona con el grupo II en 0.39. El coeficiente de correlación cofenético ($r = 0.99355$, $p = 0.0004$) mostró que la relación entre el dendrograma y la matriz de similitud es verdadera y no producto del azar. Para identificar una relación directa entre los aislamientos y/o cepas estudiadas se elaboró un árbol de tendido mínimo, donde se observó una mejor relación entre los aislamientos de MX y CO y una distancia mayor con el aislamiento de AR, así como, una distancia cercana entre el aislamiento de EUA y los aislamientos de MX del grupo I (Fig. 5).

Discusión

El aislamiento de *H. capsulatum* de distintas fuentes en la naturaleza como, guano y mamíferos silvestres infectados, es

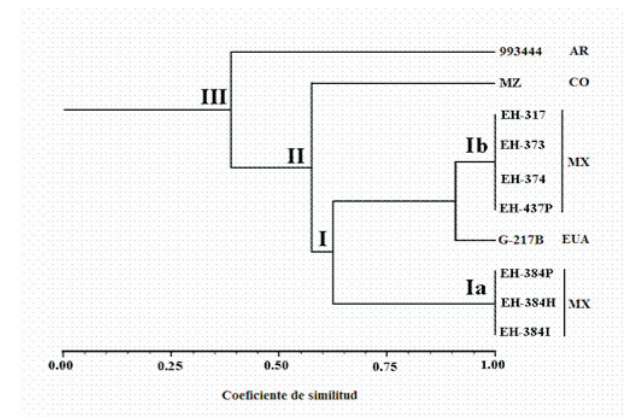


Fig. 4. Relación de similitud genética entre los aislamientos de *H. capsulatum*. El dendrograma fue generado por el método de promedios aritméticos no ponderados (UPGMA) utilizando el coeficiente de Jaccard calculado a partir de una matriz de presencia y ausencia de bandas. AR- Argentina; CO- Colombia; MX- México; EUA- Estados Unidos de América.

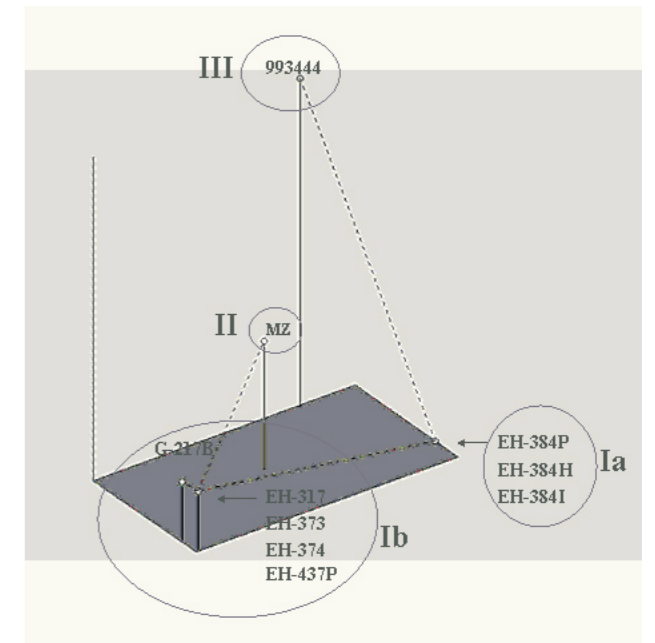


Fig. 5. Ordenamiento por árbol de tendido mínimo de los aislamientos de *H. capsulatum*. Las líneas continuas representan el plano tridimensional y las punteadas la relación directa entre los aislamientos de *H. capsulatum* estudiados, recuperados de órganos de *T. brasiliensis* (EH-384P, EH-384H y EH-384I), *D. rotundus* (EH-437P); aislamientos testigos de *A. hirsutus* (EH-373 y EH-374) y clínicos de MX (EH-317), CO (MZ), AR (993444) y EUA (G-217B).

un evento poco usual. Sin embargo, en México, la histoplasmosis humana generalmente se asocia con espacios donde habitan murciélagos [1, 8, 30-35] y es bien conocido que un gran número de especies existentes en el país, se refugian regularmente en ambientes cavernícolas [2, 17, 40], lo cual incrementa el riesgo de infección en animales o personas que incursionan en éstos ambientes.

Todas las especies de murciélagos infectados descritas a la fecha [4, 15, 29], son coloniales y de hábitos alimentarios variables (insectívoro, polínivoro, nectarívoro, frugívoro, hematófago y piscívoro), lo cual indica que la dieta no se encuentra asociada al riesgo de infección por *H. capsulatum*, en los quirópteros. Los especímenes procesados en el presente trabajo y con aislamiento positivo para el hongo tienen diferentes dietas, uno es insectívoro (*T. brasiliensis*) y el otro hematófago (*D. rotundus*), así como también tienen hábitos migratorios distintos, migrador de larga distancia (*T. brasiliensis*) y residente (*D. rotundus*).

La infección natural en murciélagos no había sido referida en México hasta los trabajos de Chávez-Tapia *et al.* [4] y Taylor *et al.* [29, 35]. En este reporte, las dos especies de murciélagos de las cuales se obtuvo aislamiento positivo representan el primer registro en México, ya que Kunz [15] refiere aislamientos de éstos especímenes en otros países.

En México, González-Ochoa [8] probó la infección experimental de *D. rotundus* con *H. capsulatum*, sin lograr éxito, sin embargo, los datos actuales con el aislamiento del patógeno del pulmón de un espécimen de *D. rotundus* indican que esta especie puede desarrollar infección natural.

El análisis genotípico, se realizó con el fin de ubicar geográficamente el patrón molecular de los aislamientos de *D. rotundus* y *T. brasiliensis*, al compararlos con patrones polimórficos de aislamientos de diferentes orígenes geográficos. En este estudio el aislamiento EH-437P capturado en la cueva "El Salitre" en el estado de MS, se ubicó con los aislamientos testigos procedentes del mismo estado, lo que indica que el murciélago *D. rotundus* se infectó en un

lugar dentro de MS, puesto que el patrón polimórfico de su aislamiento coincide con el descrito por Taylor *et al.* [27, 28] para esta zona geográfica. Mientras que un hallazgo interesante fue encontrado entre los tres aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de intestino (EH-384I), pulmón (EH-384P) e hígado (EH-384H) del espécimen *T. brasiliensis*, los cuales mostraron un patrón polimórfico idéntico entre sí, pero que difirió del patrón molecular de los aislamientos testigos de Morelos EH-373, EH-374 (murciélagos infectados) y EH-317 (humano infectado) y asimismo del aislamiento aquí descrito EH-437P (murciélago *D. rotundus*), aunque el murciélago *T. brasiliensis* fue capturado dentro del territorio nacional, en el estado de OC. Consecuentemente, el patrón de RAPD de aislamientos de *H. capsulatum* recuperados de *T. brasiliensis* podría representar otro patrón geográfico, asociado a sus refugios a lo largo de su ruta migratoria en América, donde fue probablemente infectado. Esto sería posible, tomando en cuenta que la ruta migratoria de *T. brasiliensis* incluye el sur de Brasil, continúa probablemente por Chile, atraviesa el territorio mexicano y llega a EUA, donde cruza los estados de Texas, Oregon, Nebraska y Ohio [41]. Sin embargo, los aislamientos clínicos de CO y AR mostraron distintos patrones polimórficos a los de *T. brasiliensis* (Fig. 4). Además, interesantemente este patrón se distancia genéticamente del aislamiento de AR, como lo muestra el análisis de tendido mínimo (Fig. 5) y se acerca más al aislamiento de CO.

Los datos obtenidos a la fecha, aportan informaciones importantes que permitirán en un futuro trazar un mapa epidemiológico de la enfermedad, definir nuevos parámetros para determinar su actual prevalencia en México y, probablemente, apoyar la definición de las rutas de desplazamientos de murciélagos migratorios que son uno de los posibles responsables de diseminar el patógeno fúngico en la naturaleza.

Literatura citada

- Aguirre-Pequeño, E., 1959. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del guano de murciélago en cuevas del nordeste de México. Gaceta Médica de México 89:243-53.
- Arita, H., 1993. Conservation biology of the cave bats of Mexico. Journal of Mammalogy 74:693-702.
- Carbajal-Zamora, J.R., 1977. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from tissues of bats captured in the Aguas Buenas caves, Aguas Buenas, Puerto Rico. Mycopathologia 60:167-169.
- Chávez-Tapia, C.B., R. Vargas-Yáñez, G. Rodríguez-Arellanes, G.R. Peña-Sandoval, J.J. Flores-Estrada, M.R. Reyes-Montes, M.L. Taylor, 1998. I. El murciélago como reservorio y responsable de la dispersión de *Histoplasma capsulatum* en la naturaleza. II. Papel de los marcadores moleculares del hongo aislado de murciélagos infectados. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México 11:187-191.
- Darling, S.T., 1906. A protozoon general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen and lymph nodes. The Journal of the American Medical Association 46:1283-1285.
- Disalvo, A.F., L. Ajello, J.W. Palmer, W.G. Winkler, 1969. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. American Journal of Epidemiology 89:606-614.
- Gaisler, J., 1979. Ecology of bats. In: Stoddart, M. (ed.), Ecology of small mammals. Chapman & Hall, Londres. pp.281-334.
- González-Ochoa, A., 1963. Relaciones entre el hábitat del murciélago y el *Histoplasma capsulatum*. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales México 23:81-86.
- González-Zepeda, I., R. Vargas-Yáñez, O. Velasco-Castrejón, M.L. Taylor, 1998. Histoplasmosis. Revista de la Facultad de Medicina UNAM 41:12-15.
- Hall, E.R., 1981. The Mammals of North America. J. Wiley, Nueva York.
- Hoff, G.L., W.J. Bigler, 1981. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. Journal Wildlife Disease 17:191-196.
- Kasuga, T., T.J. White, G. Koenig, J. McEwen, A. Restrepo, E. Castañeda, C. Da Silva Lacaz, E.M. Heins-Vaccari, R.S. De Freitas, R.M. Zancopé-Oliveira, Z. Qin, R. Negroni, D.A. Carter, Y. Mikami, M. Kamura, M.L. Taylor, G.F. Miller, N. Poonwan, J.W. Taylor, 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Molecular Ecology. 12:3383-3401.
- Kersulyte, D., J.P. Wood, E.J. Keath, W.E. Goldman, D.E. Berg, 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. Journal of Bacteriology 174:7075-7079.
- Klite, P.D., F.H. Diercks, 1965. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the canal zone. American Journal Tropical Medicine and Hygiene 14:433-439.
- Kunz, T.H., 1988. Ecological and behavioral methods for the study of bats. Smithsonian Institution Press, Londres.
- McMurray, D., L. Russell, 1982. Contribution of bats to the maintenance of *Histoplasma capsulatum* in a cave microfocus. American Journal Tropical Medicine and Hygiene 31:527-531.
- Medellín, R., H.T. Arita, O. Sánchez-Herrera, 1997. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Publicación Especial No. 2. AMMAC. México, D.F.
- Ouchterlony, O., L.A. Nilsson, 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. (ed.), Handbook of experimental immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp.19.1-19.44.
- Real, R., J.M. Vargas, 1996. The probabilistic basis of Jaccard's index of similarity. Systematic Biology 45:380-385.
- Reyes-Montes, M.R., M. Bobadilla Del Valle, M.A. Martínez-Rivera, G. Rodríguez-Arellanes, E. Maravilla, J. Sifuentes-Osornio, M.L. Taylor, 1999. Relatedness analyses of *Histoplasma capsulatum* isolates from Mexican patients with AIDS-associated histoplasmosis by using histoplasmin electrophoretic profiles and randomly amplified polymorphic DNA patterns. Journal of Clinical Microbiology 37:1404-1408.
- Reyes-Montes, M.R., M. Bobadilla-del Valle, M.A. Martínez-Rivera, G. Rodríguez-Arellanes, E. Flores-Robles, J. Sifuentes-Osornio, M.L. Taylor, 1998. Tipificación de los aislados clínicos de *Histoplasma capsulatum* por métodos fenotípicos y genotípicos. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México 11:195-201.
- Rholf, F.J., 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software Inc., Nueva York.
- Shacklette, M.H., F.H. Dierks, N.B. Gale, 1962. *Histoplasma capsulatum* recovered from bat tissues. Science 35:1135.
- Shacklette, M.H., H.F. Hasenclever, E.A. Miranda, 1967. The natural occurrence of *Histoplasma capsulatum* in a cave. 2. Ecologic aspects. American Journal of Epidemiology 86:246-251.
- Sneath, P.H.A., R.R. Sokal, 1973. Taxonomic structure. In: Numerical taxonomy, W.H. Freeman and Co., San Francisco. pp.188-305.
- Standard, P.G., L. Kaufman, 1976. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. Journal of Clinical Microbiology 3:191-199.
- Taylor, M.L., C.B. Chávez-Tapia, M.R. Reyes-Montes, 2000. Molecular typing of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in Mexico. Fungal Genetics and Biology 30:207-212.
- Taylor, M.L., C.B. Chávez-Tapia, A. Rojas-Martínez, M.R. Reyes-Montes, M. Bobadilla del Valle, G. Zúñiga, 2005. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. FEMS Immunology and Medical Microbiology (En prensa).
- Taylor, M.L., C.B. Chávez-Tapia, R. Vargas-Yáñez, G. Rodríguez-Arellanes, G.R. Peña-Sandoval, C. Toriello, A. Pérez, M.R. Reyes-Montes, 1999. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. American Journal Tropical Medicine and Hygiene 61:914-919.
- Taylor, M.L., J. Granados, C. Toriello, 1996. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico. Mycoses 39:375-379.
- Taylor, M.L., A. Morales-Quiroz, C.R. Chávez-Cortés, D. García-Torres, G. Montaña-Ortiz, M. Pedroza-Serés, 2000. Actualidades inmunológicas y moleculares sobre la epidemiología de la histoplasmosis en Morelos, México. Gaceta Médica de México 136:441-448.
- Taylor, M.L., A. Pérez-Mejía, J.K. Yamamoto-Furusho, J. Granados, 1997. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: Studies in the State of Guerrero, Mexico. Mycopathologia 138:137-141.
- Taylor, M.L., M.R. Reyes-Montes, M.A. Martínez-Rivera, G. Rodríguez-Arellanes, E. Duarte-Escalante, J.J. Flores-Estrada, 1997. Histoplasmosis en México. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología. Ciencia y Desarrollo 23:58-63.
- Taylor, M.L., M.R. Reyes-Montes, C.B. Chávez-Tapia, E. Curiel-Quesada, E. Duarte-Escalante, G. Rodríguez-Arellanes, G.R. Peña-Sandoval, F. Valenzuela, 2000. Ecology and molecular epidemiology findings of *Histoplasma capsulatum*, in Mexico. In: Benedik, M. (ed), Research advances in microbiology. Global research network, Kerala. pp.29-35.
- Taylor, M.L., C. Toriello, A. Pérez-Mejía, M.A. Martínez-Rivera, M.R. Reyes-Montes, L. Espinosa-Ávila, C.B. Chávez-Tapia, 1994. Histoplasmosis in the State of Guerrero, Mexico: A biological

- approach. *Revista Mexicana de Micología* 10:49-62.
36. Tewary, R.P., H. Kegel, 1971. Suppressive effect of streptomycin on the phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 44:231-240.
37. Tewary, R., L.J. Wheat, L. Ajello, 1998. Agents of histoplasmosis. In: Ajello L, Hay RJ (eds.). *Medical mycology*. Topley & Wilson's, microbiology and microbial infections. Arnold and Oxford University Press, Inc., Nueva York. pp.373-407.
38. Vaca-Marín, M.A. Martínez-Rivera, J.J. Flores-Estrada, 1998. Histoplasmosis en México, aspectos históricos y epidemiológicos. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México* 11:208-215.
39. Velasco Castrejón, O., 1998. Micosis profundas. In: García-García M.L., S. Giono-Cerezo, A. Escobar-Gutiérrez, J.L. Valdespino-Gómez. (eds.). *Infecciones respiratorias agudas y crónicas*. INDRE, Secretaría de Salud, México, D.F. pp.231-243.
40. Villa, B. 1966. Los murciélagos de México. Su importancia en la economía y salubridad. Su clasificación sistemática. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
41. Wilson, D.E., D.A.M. Reeder, 1993. *Mammals species of the world. A taxonomic and geographic references*. Smithsonian Institution Press, Washington.
42. Woods, J.P, D. Kersulyte, W.E. Goldman, D.E. Berg, 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology* 31:463-464.