



Desarrollo de una prueba rápida tipo POC (*point-of-care*) para el diagnóstico de la Histoplasmosis: Prueba de concepto

Juan David Puerta Arias

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Médicas

Director

Tonny W. Naranjo Preciado, Doctor (PhD) en Biología

Universidad Pontificia Bolivariana
Escuela de Ciencias Médicas y de la Salud
Doctorado en Ciencias Médicas
Medellín, Antioquia, Colombia

2023

El contenido de este documento no ha sido presentado con anterioridad para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o en cualquiera otra universidad.

Agradecimientos

A mi tutor principal, Dr. Tonny Naranjo, por su paciencia, por siempre estar dispuesto a compartir su conocimiento, por todo el tiempo dedicado para el desarrollo de este trabajo, y finalmente por creer en mí y alentarme a afrontar cada reto profesional y personal...

A los miembros del comité tutorial, Dra. Luz Elena Cano, Dr. Juan Pablo, Dr. Ernesto y Dr. Jahir, por sus valiosas contribuciones y acertados aportes durante el desarrollo del proyecto...

Al posgrado en Ciencias médicas de la UPB por su gestión y apoyo para lograr culminar satisfactoriamente el Doctorado...

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por estar siempre prestos a ayudarme, y quienes de una u otra forma aportaron en el desarrollo de este trabajo...

Y finalmente a mi familia, y muy especialmente a Vane, quien me apoyo incondicionalmente y me brindo la fortaleza necesaria para culminar este gran logro...

“...ningún problema importante puede ser resuelto desde el mismo nivel de pensamiento que lo generó...”

Albert Einstein

Tabla de contenido

Resumen	7
Abstract	9
CAPÍTULO I.....	10
1. Planteamiento del problema.....	11
2. Marco de Referencia	15
2.1 Histoplasmosis	15
2.1.1. Agente etiológico.....	15
2.1.2. Formas clínicas de la histoplasmosis	16
2.1.3. Epidemiología.....	17
2.1.4. Diagnóstico	18
2.2. Modelos de análisis computacional.....	20
2.2.1. Generalidades.....	20
2.2.2. Genes ortólogos, parálogos y algoritmos de análisis.....	22
2.3 Biomarcadores.....	25
2.3.1. Definición	25
2.3.2. Biomarcadores en infecciones fúngicas invasivas.....	25
2.4 Pruebas rápidas <i>POC (point-of-care)</i>	26
2.4.1. Biosensores basados en inmunocromatografía	27
3. Objetivos	30
3.1. Objetivo General	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. Referencias	31

CAPÍTULO II.	47
ARTÍCULO CIENTÍFICO	49
<i>Identification and production of novel potential pathogen-specific biomarkers for diagnosis of histoplasmosis</i>	49
CAPÍTULO III.	86
Resultados relacionados con el objetivo específico “ <i>Demostrar la interacción de los anticuerpos policlonales desarrollados frente a los antígenos de H. capsulatum mediante un prototipo beta de prueba rápida tipo POC.</i>	87
CAPÍTULO IV.	112
1. Conclusiones generales	113
2. Perspectivas	114
CAPÍTULO V.	115
1. Productos de investigación.....	116
2. Financiación	117

Lista de figuras

Figura 1. Morfotipos de <i>H. capsulatum</i>	16
Figura 2. Áreas estimadas con histoplasmosis a nivel mundial	18
Figura 3. Ilustración representativa de la homología de genes ortólogos y parálogos	22
Figura 4. Flujograma de trabajo representativo del algoritmo OrthoMCL	24

Resumen

La realidad actual en nuestro entorno es que gran parte de la población tiene dificultades para acceder a los servicios básicos de atención en salud y al diagnóstico oportuno de muchas de las enfermedades infecciosas de importancia. Este panorama es aún peor si se tiene en cuenta que, por lo general, este tipo de enfermedades afectan principalmente a población vulnerable, ubicada en entornos territoriales de alta ruralidad.

La histoplasmosis, infección fúngica de amplia distribución a nivel mundial y considerada como endémica para los continentes de América y África, es una enfermedad que ha tomado gran importancia en los últimos años, debido al aumento en el número de personas susceptibles a infectarse y desarrollar las formas clínicas más severas, incluyendo aquellos pacientes con VIH/SIDA o que reciben terapias biológicas inmunosupresoras.

En Colombia, aunque se desconoce la magnitud e impacto real de esta micosis sobre la población, podría llegar a considerarse como un serio problema de salud pública, debido a los altos porcentajes de prevalencia y mortalidad, los fracasos terapéuticos y la dificultad diagnóstica reportada en la mayoría de los estudios.

Habiendo identificado la necesidad de generar nuevas herramientas de diagnóstico con mayor capacidad para determinar específicamente al agente fúngico causal de la enfermedad, y que se puedan utilizar fácilmente utilizados en los laboratorios como prueba de rutina, en el presente trabajo nos propusimos desarrollar una plataforma biotecnológica enfocada en la búsqueda, identificación, producción y validación a nivel de laboratorio de nuevos biomarcadores de diagnóstico y demostrar su interacción mediante una plataforma tipo biosensor electroquímico para evaluar su potencial aplicación como prueba rápida en el punto de atención (*POCT*, del inglés, *Point-of-Care test*).

Los resultados obtenidos en este trabajo incluyen la identificación de 2 genes específicos para la histoplasmosis y candidatos a ser considerados como biomarcadores de diagnóstico, y el desarrollo de un prototipo beta de prueba rápida, tipo inmunosensor electroquímico, con potencial aplicación para el diagnóstico de la histoplasmosis.

Así mismo, se logró consolidar una línea de investigación dedicada al desarrollo y validación de técnicas de laboratorio aplicadas al diagnóstico de enfermedades infecciosas de importancia a nivel local como las infecciones causadas por hongos patógenos.

Palabras clave: Histoplasmosis, Prueba de diagnóstico rápido, biomarcadores, inmunodiagnóstico

Abstract

In our environment, a significant portion of the population faces challenges in accessing basic healthcare services and timely diagnosis of infectious diseases, particularly vulnerable communities situated in highly rural areas.

Histoplasmosis, a widely distributed mycosis globally and considered endemic to the continents of America and Africa, has gained importance in recent years due to the increasing susceptibility of the population to infection and the development of more severe clinical forms. This includes patients with HIV/AIDS or those undergoing immunosuppressive biological therapies.

In Colombia, although the true magnitude and impact of this mycosis on the population are unknown, it is regarded as a serious public health problem. This is due to high prevalence and mortality rates, therapeutic failures, and diagnostic challenges reported in the majority of studies.

Within this context and having identified the need for new diagnostic tools that are rapid, user-friendly, and possess greater specificity in determining the fungal agent causing the disease, this study aimed to develop a biotechnological platform focused on the identification, production, and laboratory-level validation of new diagnostic biomarkers. Additionally, we sought to demonstrate their interaction through an electrochemical biosensor platform, evaluating its potential application as a rapid point-of-care test (POCT).

The results obtained in this study include the identification of two specific genes that could be considered diagnostic biomarkers. Furthermore, a beta prototype of a rapid test, employing an electrochemical immunosensor, was developed with the potential for diagnosing histoplasmosis. Simultaneously, we successfully established a research line dedicated to the development and validation of diagnostic methods for diseases caused by pathogenic fungi, specifically addressing local importance.

Keywords: Histoplasmosis, Rapid Diagnostic Tests, biomarkers, immunodiagnosis

CAPÍTULO I.

1. Planteamiento del problema

Hoy en día, las enfermedades infecciosas, y en especial las infecciones respiratorias, son consideradas como una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En Colombia, según un informe de *Análisis de Situación de Salud* presentado por el Ministerio de Salud y Protección Social, para el año 2020 este grupo de enfermedades produjo el 33% del total de muertes reportadas al año en la población, de las cuales el 52% fue asociada con infecciones del tracto respiratorio [1]. Sumado a lo anterior, otros factores como la globalización, el aumento de microorganismos con resistencia a los antimicrobianos disponibles, el incremento en el número de personas inmunosuprimidas y las dificultades que existen para acceder a los servicios básicos de atención en salud han favorecido la aparición y rápida diseminación de más enfermedades infecciosas en la población.

En ese sentido, es ampliamente conocido que un estado de inmunosupresión, el cual puede ser generado por múltiples causas, incluyendo el desarrollo de SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana) por la infección con el virus VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el uso de terapias biológicas inmunosupresoras y las quimioterapias, aumentan el riesgo a desarrollar enfermedades infecciosas causadas por patógenos oportunistas, incluyendo las infecciones fúngicas invasivas (IFIs) como la histoplasmosis, la neumonía por *Pneumocystis*, la aspergilosis, la criptococosis, entre otras [2-4]. En Latinoamérica, las IFIs son consideradas como un serio problema, debido a sus altos porcentajes de prevalencia y mortalidad, su dificultad diagnóstica, así como por la demora que existe en el inicio del tratamiento antifúngico [4-6].

Hablando específicamente de la histoplasmosis, enfermedad causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, se estima que cerca de 500.000 nuevas infecciones se presentan cada año en el mundo, principalmente en aquellas regiones que reportan mayor tasa de incidencia, siendo considerada como una de las micosis endémicas con mayor número de casos a nivel mundial [7, 8]. En Colombia, algunos reportes epidemiológicos permiten considerarla como una micosis de alta frecuencia, principalmente en pacientes VIH/SIDA, quienes tienden a

desarrollar las formas clínicas más severas de la enfermedad, y llegan a presentar tasas de mortalidad hasta del 90% cuando no es diagnosticada y tratada oportunamente [9-11].

En un estudio desarrollado por los grupos de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia y de Micología Médica y Experimental de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), se reportó un total de 434 casos de histoplasmosis con diagnóstico confirmado entre los años 1992 a 2008, de los cuales un 77% presentaba algún estado de inmunosupresión, siendo la mayoría asociada a VIH/SIDA [12].

En otro estudio publicado por Cáceres y colaboradores [10], en el cual se analizaron muestras biológicas de 768 pacientes con sospecha clínica de infección pulmonar, se reportó una incidencia para histoplasmosis del 17% y del total de estos pacientes, el 79% tenían coinfección con VIH y presentaban cuadros clínicos severos asociados con el desarrollo de las formas diseminadas de la enfermedad.

Actualmente el diagnóstico de la histoplasmosis puede realizarse con métodos microbiológicos, inmunológicos y/o moleculares, siendo el cultivo microbiológico, la prueba diagnóstica de referencia. Sin embargo, el agente causal de esta micosis es un hongo de crecimiento lento, por lo que pueden pasar varias semanas antes de observar la presencia evidente de un aislamiento fúngico a partir de la muestra clínica, generando un potencial retraso en el diagnóstico de esta enfermedad [13-15].

Como alternativa al cultivo se puede realizar una evaluación directa de las muestras clínicas por microscopio, ya sean biopsias de tejido o lavados y/o aspirados respiratorios, con el objeto de confirmar la presencia de las levaduras de *H. capsulatum*. Aunque este método permite llegar a un diagnóstico más rápido (de 4h a 24h) comparado con el cultivo, su sensibilidad depende en gran medida de la experticia del observador, por lo que en muchos casos llega a ser muy baja (<50%) [16, 17].

Sobre las pruebas inmunológicas, ampliamente utilizadas como método de diagnóstico convencional, aunque ofrecen un mejor rendimiento comparado con los métodos microbiológicos, en algunos casos llegan a tener una especificidad analítica variable (entre 40% y 80%) y presentar falsos positivos por reacción cruzada en muestras de pacientes con otras infecciones fúngicas de importancia clínica como la criptococosis, la aspergilosis, la peniciliosis, la

paracoccidiodomicosis, entre muchas otras. Esto debido a la naturaleza ubicua de los biomarcadores de diagnóstico, generalmente antígenos de superficie, utilizados comúnmente en estas pruebas, siendo en su mayoría polisacáridos de pared celular que pueden estar presentes en un amplio rango de especies fúngicas [18-21]. Otro aspecto limitante de este tipo de pruebas es el bajo número de laboratorios que pueden ofrecerlas como un servicio de rutina y la poca disponibilidad de los kits con mejor rendimiento reportado en los países de América Latina [18, 22].

Por último, se encuentran las pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés), que se han convertido en una valiosa herramienta diagnóstica, permitiendo la detección del ADN fúngico con una alta sensibilidad y especificidad (>90%, para ambos parámetros) [23, 24]. Sin embargo, su adecuada implementación requiere de infraestructura, equipos de alto costo y personal calificado, lo cual restringe su acceso a muchas de las instituciones de salud en el país. Adicionalmente, según la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer y el Consorcio de Educación e Investigación del Grupo de Estudio de Micosis (EORTC/MSGERC), este tipo de métodos no son considerados aún como una prueba diagnóstica confirmatoria de infección, por lo que toda muestra con resultado positivo, debe ser confirmada con un método diferente, teniendo en cuenta que no siempre un resultado positivo indica un estado activo de la enfermedad [25].

Considerando este panorama actual de la histoplasmosis, y las dificultades que aún presentan los métodos de diagnóstico convencional utilizados para esta micosis, surge la necesidad de desarrollar nuevas herramientas de laboratorio más versátiles y de mayor rendimiento utilizando biomarcadores de diagnóstico más específicos contra el agente fúngico.

En ese sentido, las pruebas rápidas de punto de atención (POCT, del inglés *Point-of-Care test*), definidas como aquellas pruebas de diagnóstico realizadas justo al lado del paciente y con capacidad de generar un resultado preciso en minutos, vienen siendo consideradas en la práctica clínica como una posible solución a las necesidades de diagnóstico microbiológico para muchas enfermedades de origen infeccioso, debido a su fácil uso e interpretación, bajo costo y portabilidad [26-28].

Teniendo claro todo lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos implementar una estrategia para la búsqueda, identificación y validación en el laboratorio de nuevos y potenciales biomarcadores específicos para el hongo *H. capsulatum*, utilizando herramientas computacionales, el análisis de datos ómicos (genómica, transcriptómica y proteómica) y otros datos experimentales previamente reportados en la literatura. Adicionalmente, nos planteamos evaluar sobre un prototipo beta de prueba rápida, la interacción de unos anticuerpos policlonales desarrollados contra los biomarcadores específicos para el hongo *H. capsulatum* previamente identificados.

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente propuesta podrían servir como prueba de concepto para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico inmunológico y la estrategia implementada tendría el potencial de ser aplicada como plataforma para la búsqueda e identificación de nuevos biomarcadores en un amplio rango de agentes infecciosos.

2. Marco de Referencia

2.1 Histoplasmosis

2.1.1. Agente etiológico

La histoplasmosis, es causada por especie de hongo del género *Histoplasma*, *filo* (phylum) Ascomycota, orden Onygenales, familia Ajellomycetaceae. A la fecha, se han identificado 3 variedades para este hongo basado en su micromorfología, relación con el hospedero, distribución geográfica y formas clínicas que produce; *H. capsulatum* (*Hc*) *var. capsulatum* (distribuida a nivel global, y agente clásico de la enfermedad en humanos), *Hc var. duboisii* (agente patógeno del continente africano) e *Hc var. farciminosum* (agente patógeno en equinos) [29]. Adicionalmente, se ha reconocido una clasificación filogeográfica propuesta por Kasuga *et al* [30] basado en una secuenciación parcial de 4 genes codificantes (*arf*, *H-anti*, *ole1*, *tub1*) en la cual se definen 8 grupos o clados; norteamericano clase 1 (NAM1), norteamericano clase 2 (NAM 2), latinoamericano grupo A (Lam A), latinoamericano grupo B (LAm B), australiano, holandés, euroasiático y africano. Recientemente, varios autores han publicado diferentes estudios sugiriendo nuevas reorganizaciones taxonómicas para este hongo, utilizando diferentes herramientas moleculares y marcadores genéticos, incluyendo microsatélites, alelos múltiples o polimorfismos a nivel genético. Sin embargo, dichas sugerencias aún no han sido consideradas internacionalmente [31].

A nivel biológico, *H. capsulatum* se caracteriza por ser un hongo dimórfico térmico, es decir, con capacidad para crecer en ambientes naturales (entre los 18°C y 30°C) de forma saprofita o filamentosa, y a temperaturas mayores a 35°C en forma levaduriforme, siendo esto considerado como un factor de virulencia. En el ambiente, suele crecer en suelos con alto contenido de nitrógeno orgánico, incluyendo cuevas y bosques con guano de murciélago o excremento de aves, en los cuales produce 2 tipos de conidias; macroconidias, de pared gruesa y con un diámetro de 7 a 15µm, y microconidias, de pared delgada y con un diámetro entre 2 a 5µm, siendo estas últimas las formas infectantes del hongo. Bajo otras condiciones de crecimiento, ya sea *in vitro* a 37°C o cuando entra en contacto con el hospedero, el hongo se transforma en su fase levaduriforme, característico por la formación de blastoconidias ovales, con una longitud entre 2 a 4µm, que pueden llegar a ser observadas al interior de las células fagocíticas en el hospedero infectado (Ver figura 2) [32].

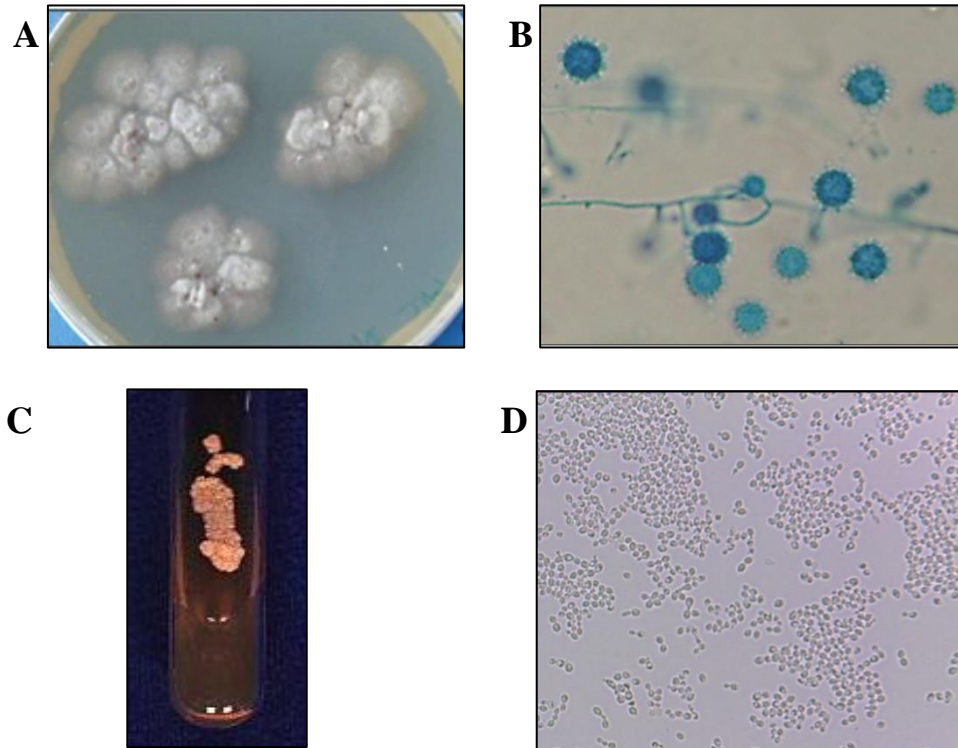


Figura 1. Morfotipos de *H. capsulatum*. Fase miceliar, apariencia macroscópica (A) y microscópica (B) de las colonias cultivadas a temperatura ambiente. Fase levaduriforme, apariencia macroscópica (C) y microscópica (D) de las colonias cultivadas a 37°C. Fuente: Muñoz C *et al.* Infectio. 2010; 14(S2): S145-S158 [17].

2.1.2. Formas clínicas de la histoplasmosis

La histoplasmosis, es una de las micosis de mayor importancia a nivel mundial, que representa un grave problema de salud pública, especialmente para aquellos pacientes que presentan algún estado de inmunosupresión.

La infección por *H. capsulatum*, se adquiere por la inhalación de las formas infectantes (microconidias y fragmentos de hifa) presentes en ambientes enriquecidos con fuentes de nitrógeno. Aunque el desarrollo de la enfermedad y la aparición de las manifestaciones clínicas dependen de varios factores, incluyendo la magnitud de la exposición (tamaño del inóculo inhalado), el estado inmunológico del hospedero o la presencia de otras enfermedades pulmonares de base [33], se ha

descrito que, por lo general, las condiciones de inmunosupresión y las edades extremas de la vida representan los principales factores de riesgo asociados con la aparición de la histoplasmosis en su forma clínica más severa, siendo los pacientes VIH/SIDA los más propensos a desarrollarla [11, 34].

Actualmente, la definición de las formas clínicas de la histoplasmosis se realiza según los criterios de clasificación propuestos por Goodwin y colaboradores, a saber: infección asintomática, histoplasmosis pulmonar aguda, histoplasmosis pulmonar crónica e histoplasmosis diseminada progresiva (HDP), siendo esta última la forma más severa y mortal de la enfermedad y la más asociada a pacientes inmunosuprimidos [33, 35].

En la HDP, el cuadro clínico se caracteriza por la presencia de fiebre, cefalea, malestar general, pérdida de peso, síntomas respiratorios (tos con expectoración, disnea), alteraciones hematológicas (anemia, leucopenia) y formación de infiltrados celulares y cavitaciones a nivel pulmonar, acompañados de lesiones en piel y mucosas (hasta 25% de los pacientes VIH/SIDA) o hepatomegalia (50% de los casos) [32, 36]. Adicional a estas manifestaciones clínicas, también se pueden presentar en menor proporción, otras complicaciones y secuelas como el síndrome ocular o el histoplasmosoma [32, 37].

2.1.3. Epidemiología

Esta micosis posee una amplia distribución geográfica, siendo ya reportada en más de 60 países en todos los continentes y declarada como una enfermedad endémica para los continentes de América y África (Figura 2) [36, 38]. De acuerdo con algunos estudios, se estima que cerca de 40 millones de personas han sido infectadas con el hongo y se presentan cerca de 500.000 nuevos casos de infección cada año [39]. Actualmente, la histoplasmosis, es considerada como una enfermedad marcadora de VIH/SIDA, siendo reportada hasta en un 25% de los pacientes con esta condición [11, 40].

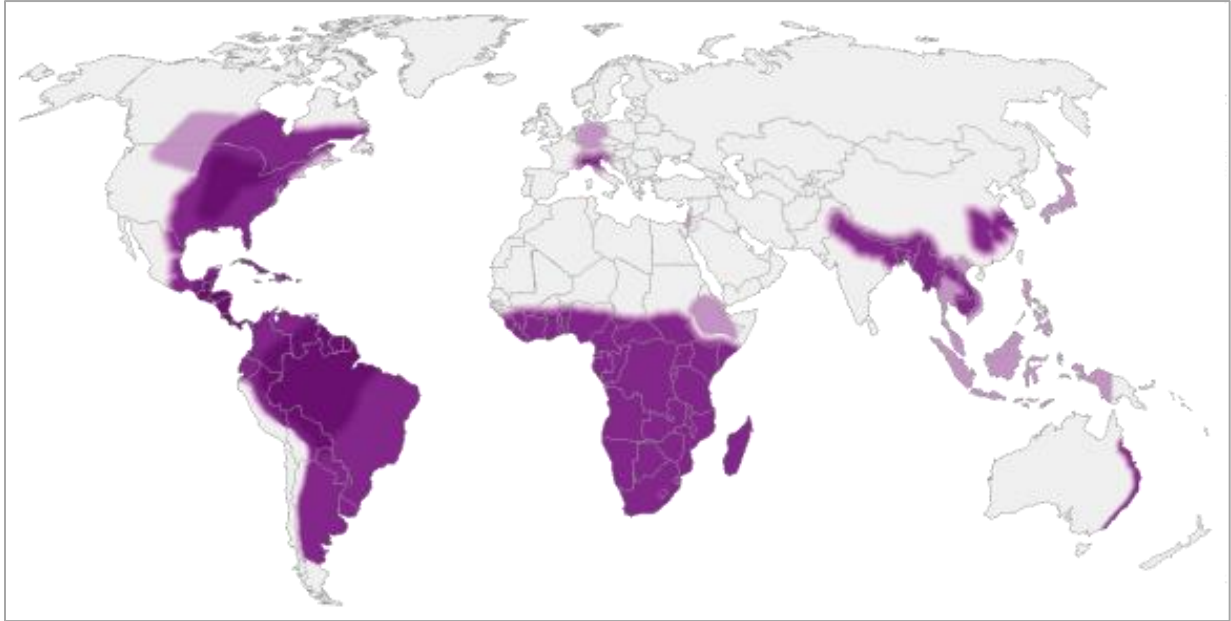


Figura 2. Áreas estimadas con histoplasmosis a nivel mundial. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). URL: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/histoplasmosis/causes.html>

2.1.4. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la histoplasmosis, se pueden utilizar métodos microbiológicos, inmunológicos y moleculares.

Los métodos microbiológicos, hacen referencia a todas aquellas pruebas que tienen como objetivo identificar y demostrar la presencia directa del hongo en las muestras clínicas, ya sea por visualización microscópica o por aislamiento en medios de cultivo. Ambos son considerados como las pruebas convencionales o de rutina más utilizados para el diagnóstico de la histoplasmosis [17, 41].

La visualización microscópica de las formas fúngicas (levaduras) de *H. capsulatum*, puede realizarse con las muestras clínicas en fresco o mediante el uso de coloraciones especiales como Wright, Giemsa, ácido peryódico de Schiff (PAS) o plata metenamina, las cuales facilitan la observación de las levaduras del hongo ubicadas al interior de las células fagocíticas. Sin embargo, la sensibilidad de este método es muy baja, ya que depende en gran medida de la experticia del observador, el tipo de presentación clínica así como de la calidad de la muestra, encontrando valores entre un 10 y 30% para las formas de histoplasmosis pulmonar y hasta máximo un 40% para HDP [17, 32]. Adicionalmente, el tipo de lesión de piel y las estructuras fúngicas pueden ser

fácilmente confundidas con otros microorganismos, entre los que se incluyen *Candida spp.*, *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*, *Leishmania spp.*, complejo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* y *Blastomyces dermatitidis*, afectando la especificidad de la prueba [13, 36, 42].

El cultivo microbiológico, es considerado como el método de referencia para el diagnóstico de infección por *H. capsulatum*. Entre los medios de cultivo más utilizados para el aislamiento del hongo se encuentran el agar Sabouraud-dextrosa, el agar Mycosel o el agar infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) enriquecido con sangre o aminoácidos esenciales. No obstante, la principal limitante de este método es que puede tardar entre 4 y 6 semanas para llegar a obtener un crecimiento evidente del hongo [41].

Los métodos inmunológicos, tienen como fin demostrar la presencia del hongo a través de la detección de alguno de sus componentes antigénicos o de anticuerpos producidos en respuesta a la infección. La inmunodifusión, la fijación de complemento y la técnica de ELISA (directa o indirecta), son algunas de las pruebas más utilizadas en los laboratorios de rutina, dada su practicidad y poco tiempo de procesamiento requerido (entre 24h y 48h) comparado con los métodos microbiológicos, siendo en algunos casos la primera y única evidencia de una posible infección [17, 18].

En general, el rendimiento analítico (sensibilidad y especificidad) de estas pruebas oscila entre un 70% y un 94%. No obstante, para la adecuada interpretación de los resultados, se debe tener cuenta la forma clínica y el estado inmune del paciente, siendo poco recomendada la medición de anticuerpos anti-*Histoplasma* circulantes en suero de pacientes VIH/SIDA, dado precisamente su condición de inmunosupresión [43].

En la actualidad, existen 2 grandes marcas que comercializan pruebas inmunológicas tipo ELISA para la identificación de antígenos polisacáridos de *H. capsulatum* a partir de muestras de suero y orina. Sin embargo, una de éstas, *Mvista® Histoplasma Quantitative EIA test* (Miravista Diagnostics, Indianápolis, USA) es ofrecida únicamente para Estados Unidos [44] y la otra, *IMMY® ALPHA Histoplasma Antigen EIA test* (Immuno-Mycologics, Inv., Norman, OK), está restringida para algunos países de América Latina y solo es recomendada en muestras de orina [45]. Por otro lado, varios autores han reportado resultados discrepantes cuando evalúan una misma muestra con ambos kits [19, 20, 46, 47]. Adicionalmente, y debido a la naturaleza ubicua de los

antígenos polisacáridos utilizados en estas pruebas, es común observar reacciones cruzadas con otras infecciones fúngicas similares y de igual importancia clínica como la aspergilosis, la paracoccidiodomicosis, la blastomicosis, la criptococosis, las esporotricosis o la candidiasis [21, 48-51].

En los últimos años, los métodos moleculares como la *PCR* han emergido como una herramienta prometedora para el diagnóstico de múltiples enfermedades incluyendo la histoplasmosis, siendo también empleada para demostrar la presencia del hongo en muestras de suelos [52]. Actualmente, existen muchos estudios reportados en la literatura utilizando este método. Sin embargo, la mayoría fueron estandarizados localmente (*in house*), basados en la amplificación de una diversidad de blancos moleculares y con valores de sensibilidad y especificidad variables (entre 69-100% y 77-100%, respectivamente), y no se encuentran disponibles comercialmente [24, 53, 54].

Finalmente, se debe resaltar que otra de las desventajas que presentan este tipo de pruebas, es la dificultad que tienen muchos laboratorios para acceder a este tipo de metodologías, a causa de la gran inversión que se requiere en infraestructura, equipos y personal calificado para lograr implementarla adecuadamente [41, 55].

2.2. Modelos de análisis computacional

2.2.1. Generalidades

La Agencia Nacional de Salud de los Estados Unidos (*NIH, National Institutes of Health*) define el concepto de *bioinformática* como la aplicación de herramientas de computación y análisis para la interpretación de datos biológicos en los campos de la matemática, la física, la biología y las ciencias médicas [56]. Hoy en día, las herramientas bioinformáticas han tomado un papel fundamental en el campo de la medicina moderna, siendo aplicadas en múltiples estudios, la mayoría con un enfoque predictivo, analizando secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) o aminoácidos (proteínas) obtenidos a partir de una muestra biológica [57, 58], para identificar mutaciones y/o polimorfismos genéticos asociados con trastornos clínicos, caracterizar perfiles de

expresión genética específicos para ciertas enfermedades, o para el análisis y modelado de la estructura, funcionalidad o interacción molecular de un grupo particular de genes [59].

En las últimas décadas, se ha evidenciado un desarrollo progresivo de las tecnologías de secuenciación *NGS* (del inglés, *Next Generation Sequencing*), permitiendo procesar una gran cantidad de muestras de forma masiva y con mayor precisión, y generando a su vez un aumento considerable en la cantidad de información obtenida en cada estudio y en el número de aplicaciones bioinformáticas y herramientas computacionales para el almacenamiento, organización, análisis y visualización de los datos [60, 61].

En la actualidad, existen cientos de repositorios (bases de datos) públicos y privados con información indexada y clasificada de datos biológicos obtenidos de estudios de tipo genómico, transcriptómico y/o proteómico. Entre los más destacados a nivel internacional se encuentran el *EMBL's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)* [www.ebi.ac.uk], el *Broad Institute of Harvard and MIT* [www.broadinstitute.org], el *Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)* [www.sib.swiss], el *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* [www.ddbj.nig.ac.jp] y el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* [www.ncbi.nlm.nih.gov], siendo este último uno de los más utilizados, dado que cuenta con una robusta cantidad de datos de genes y proteínas de múltiples organismos, integrados mediante un sistema de búsqueda, navegación y recuperación que permite acceder fácilmente a toda la información relacionada de una determinada secuencia. Sin embargo, es importante mencionar que la calidad y confiabilidad de la información incluida en los repositorios dependerá del flujo de trabajo, la técnica de secuenciación y los métodos de curación, ensamblaje y anotación de la información obtenida por cada estudio.

En su mayoría, las investigaciones enfocadas en genómica y proteómica comparativa inician con un análisis de similitud entre secuencias, proceso imprescindible y de gran importancia en estudios evolutivos de conservación, especiación y funcionalidad [62, 63]. Una de las aplicaciones más utilizadas es la herramienta bioinformática *BLAST* (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) desarrollada por el NCBI, que permite analizar de forma cuantitativa la similitud entre una secuencia de interés y otras secuencias incluidas en una base de datos determinada [64, 65]. En la actualidad, esta herramienta sigue teniendo gran influencia y muchas otras aplicaciones la incluyen en su flujograma de trabajo para brindar información sobre taxonomía, filogenia y homología de secuencias. Cada una de estas aplicaciones presenta

características de rendimiento, tipología de datos y manejo de la información diferentes y su uso dependerá de los requerimientos u objetivos definidos previamente en el estudio.

2.2.2. Genes ortólogos, parálogos y algoritmos de análisis

Desde el área de la genética y la biología evolutiva, el concepto de homología, definido como aquella relación de descendencia común de un grupo particular de genes, ha sido ampliamente aplicado para el estudio, caracterización y clasificación funcional de las proteínas [62]. Dicho concepto permite dividir los genes homólogos en 2 subcategorías fundamentales, ortólogos y parálogos. El primero hace referencia a aquellos genes (proteínas) que, debido a ciertos eventos de especiación y/o divergencia se encuentran presentes en diferentes organismos (especies) manteniendo siempre la misma función [66]. El segundo, en cambio, se refiere a un grupo particular de genes que están presentes en el genoma de una misma especie como resultado de un evento de duplicación, y comparten un mismo ancestro común, pero pueden diferir en términos de expresión, conformación estructural o funcionalidad [67]. En la figura 3 se ilustra la definición de genes ortólogos y parálogos, utilizando como ejemplo un gen A en dos especies distintas (especie 1 y 2).

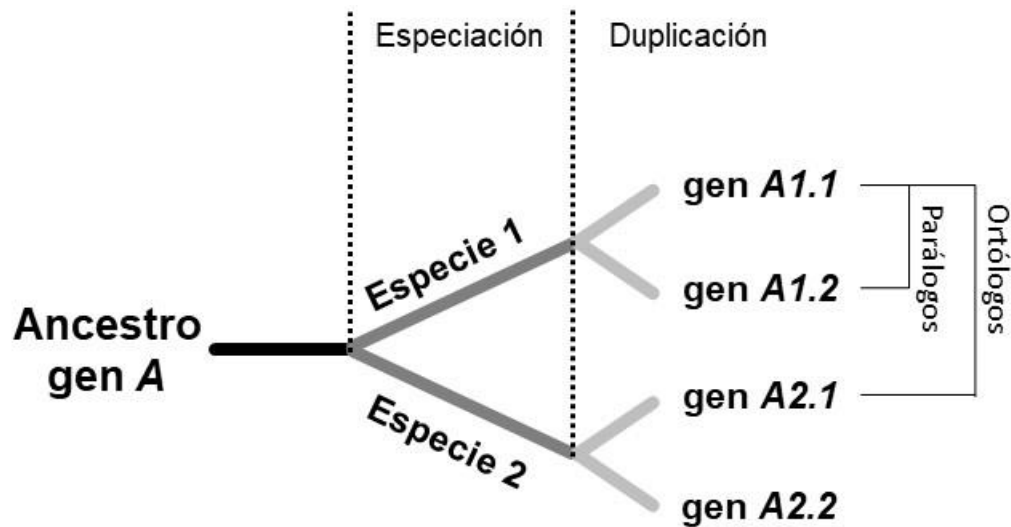


Figura 3. Ilustración representativa de la homología de genes ortólogos y parálogos.

La distinción de ambos subgrupos de genes es crucial para el correcto análisis de nuevas secuencias genómicas, especialmente en los procesos de anotación estructural y distribución por localización subcelular o proceso biológico [68]. En el año 1997, el NCBI creó la base de datos

COG (del inglés, *Clusters of Orthologous Genes*) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/COG>], con el objetivo de extraer, analizar y clasificar la mayor cantidad de información obtenida en los estudios de secuenciación genómica realizados hasta ese momento [69]. Actualmente, esta base de datos incluye el análisis genómico completo de más de 1100 géneros de bacterias, 43 especies de organismos eucariotas y más de 4000 clústeres (familias) de proteínas homólogas, clasificadas de acuerdo con su función biológica, siendo más limitada con otro tipo de organismos eucariotas de mayor complejidad de análisis, debido a la extensiva presencia de genes duplicados, funcionalmente redundantes o compuestos de estructuras multidominio [70, 71].

Igualmente, otros autores han planteado nuevas estrategias y herramientas de análisis, clasificación y anotación funcional de genomas complejos. Sin embargo, cada una de estas herramientas presenta características funcionales que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar los modelos de estudios, incluyendo el número de secuencias y/o microorganismos a analizar, el nivel de conocimiento en programación requerida para aplicar algoritmos más complejos, los requisitos de equipo de cómputo y servidores, etc. [72]. Entre las herramientas bioinformáticas se resaltan los algoritmos INPARANOID [73, 74] y OrthoMCL [75], siendo considerados por algunos autores como los métodos tradicionales para este tipo de estudios [72, 76].

Por un lado, el programa INPARANOID, publicado inicialmente por Remm y colaboradores [74], permite clasificar los genes en grupos ortólogos y parálogos, basado en un análisis de alineamiento de secuencias e incluyendo algunas reglas adicionales para identificar otros genes parálogos que surgen de la duplicación posterior a la especiación (in-parálogos). Sin embargo, una de las principales desventajas que presenta este programa, es que cada proceso de análisis comparativo debe ser realizado con 2 especies de organismos [73, 74].

Por otra parte, la herramienta OrthoMCL, ampliamente utilizada para la identificación de proteínas ortólogas entre múltiples especies, está basada en una estrategia de análisis robusto de similitud de secuencias, que incluye un proceso de comparación denominado *all vs all BLAST* que involucra la estrategia del mejor hit recíproco, y la aplicación del algoritmo de clústeres jerárquicos por grafos de *Markov* [77], que brindan la capacidad de analizar múltiples secuencias de genes de 2 o más especies de organismos [75]. En la figura 3, se demuestra el flujograma de trabajo propuesto por los autores para aplicar correctamente el algoritmo OrthoMCL.

En la actualidad, existen varios reportes de estudios en los cuales se utilizó esta herramienta OrthoMCL, principalmente para la identificación de genes ortólogos entre especies como evidencia de procesos evolutivos, de diversidad y de interacción hospedero-parasito [78-80]. No obstante, no se ha encontrado evidencia de alguna investigación enfocada en aplicar dichas herramientas para la búsqueda e identificación de proteínas únicas de especie con potencial aplicación como biomarcador de diagnóstico de una enfermedad infecciosa.

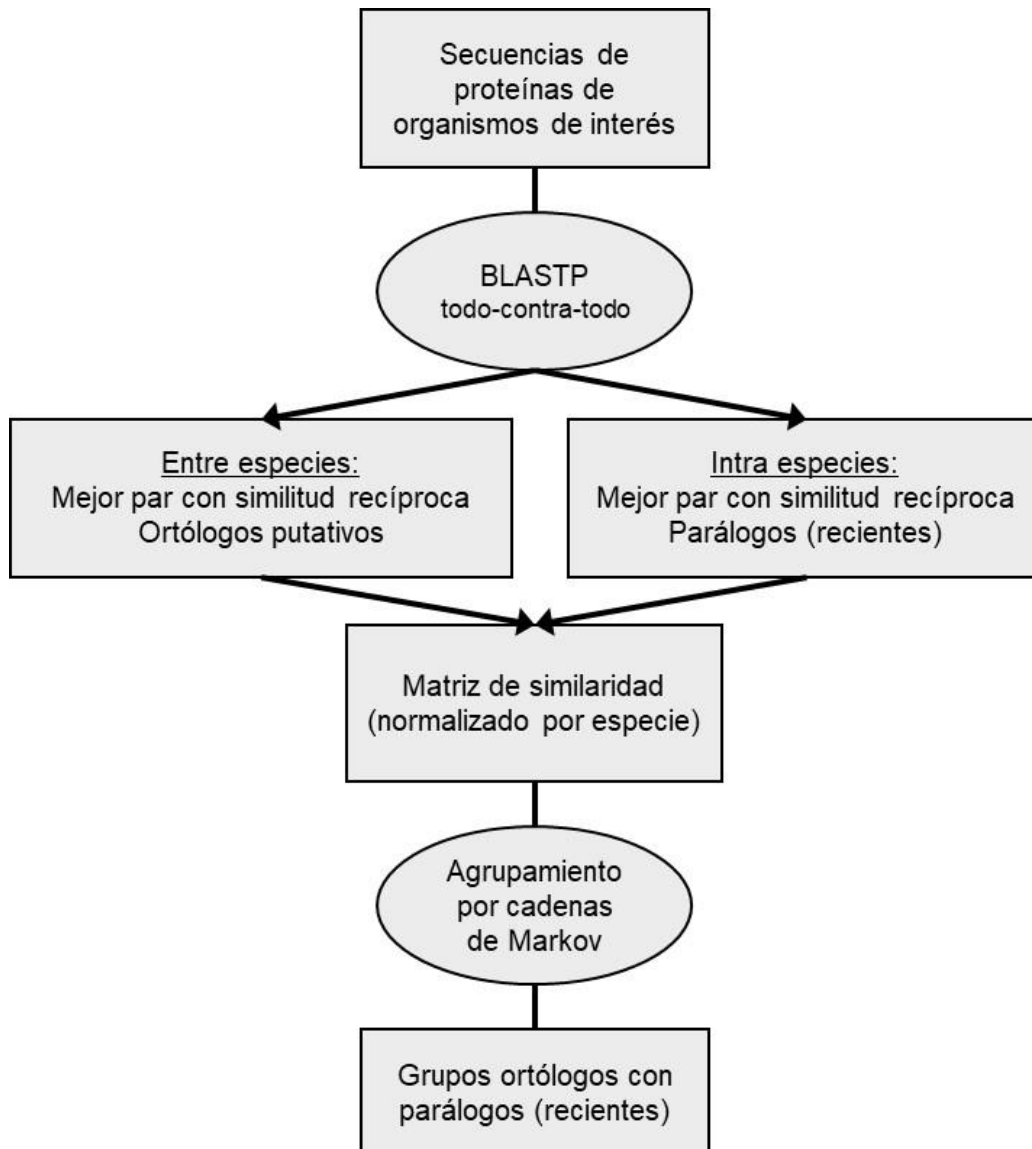


Figura 4. Flujo de trabajo representativo del algoritmo OrthoMCL. Tomado de: Li et al (2003). *Genome Res. Sep*;13(9). DOI: OrthoMCL: 10.1101/gr.1224503

2.3 Biomarcadores

2.3.1. Definición

La Organización Mundial para la Salud (OMS), definió el concepto de biomarcador como “cualquier sustancia, estructura o proceso que puede ser medible en el cuerpo e influir o predecir la incidencia de un resultado o una enfermedad” [81]. En el campo de la medicina, un biomarcador biológico es considerado como aquella característica indicadora de normalidad o de respuesta a un proceso inflamatorio, infeccioso, de exposición o de intervención (quirúrgica o de tratamiento) [82, 83].

Para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, los biomarcadores pueden ser biomoléculas, asociadas a un microorganismo en particular, que al ser detectada en la muestra clínica permiten confirmar la presencia del patógeno y en algunos casos la condición de interés (colonización o enfermedad) en el paciente [81]. Dicha biomolécula, también puede ser utilizada para hacer seguimiento y monitorear la efectividad del tratamiento.

Por lo general, las biomoléculas más utilizadas son proteínas secretadas al medio extracelular, que pueden estar involucradas en los procesos biológicos de replicación o metabolismo del agente infeccioso, o en las fases de adherencia, patogénesis o inactivación de los mecanismos de respuesta inmune en el hospedero infectado. Sin embargo, en algunos casos, otro tipo de biomoléculas como lípidos, carbohidratos o ácidos nucleicos (ADN o ARN), pueden ser también utilizados como biomarcadores de diagnóstico, dado que pueden estar presentes en circulación debido a procesos simples de lisis celular [82].

2.3.2. Biomarcadores en infecciones fúngicas invasivas

Para el caso de las infecciones producidas por hongos, muchas de las pruebas de diagnóstico desarrolladas van dirigidas contra componentes estructurales de la pared celular, principalmente polisacáridos como los β -glucanos y los galactomananos, que están presentes de forma ubicua en las levaduras o filamentos de hifa de la mayoría de las especies fúngicas [84-86]. Durante el proceso patogénico de la infección, muchos de estos compuestos son liberados al torrente sanguíneo, activando la respuesta inmune y otros procesos de señalización en el hospedero infectado.

Los β -glucanos (BG), polisacáridos compuestos de polímeros de glucosa, son biomoléculas que pueden ser producidas por especies fúngicas de los géneros *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Histoplasma* spp., *Pneumocystis* spp., *Coccidioides* spp., entre otros, siendo detectados mediante pruebas inmunológicas hasta 10 días antes de observar las primeras manifestaciones clínicas de infección fúngica invasiva en los pacientes [87]. Sin embargo, la reactividad en estas pruebas también se ha relacionado con otros procesos como bacteriemias, hemodiálisis o por contacto con materiales cubiertos con algodón y/o gasas quirúrgicas [88]. En el caso del galactomanano (GM), heteropolisacárido resistente al calor, es un biomarcador diagnóstico presente en la pared celular de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Cryptococcus* spp. [89]. Aunque no se han logrado definir los mecanismos asociados con la liberación del antígeno y su circulación en sangre, sí se ha demostrado su rendimiento diagnóstico para clasificar a los pacientes con aspergilosis invasiva y hacer seguimiento durante el tratamiento antifúngico, siendo detectado en muestras respiratorias como lavados broncoalveolares y otras muestras extrapulmonares como suero y fluido cerebroespinal [90, 91].

Así mismo, se han publicado otros pocos estudios reportando el uso de biomarcadores antigénicos específicos para ciertas especies de hongo como *Cryptococcus* spp., *Blastomyces* spp. e *Histoplasma capsulatum*, cada uno con rendimientos de sensibilidad y especificidad variables, dependientes de la plataforma de diagnóstico utilizada (ensayo tipo ELISA, de flujo lateral, inmunofluorescencia, etc.), el tipo de muestra y la condición clínica del paciente [92]. No obstante, para otros agentes fúngicos de igual importancia en salud, como *Sporothrix*, *Pneumocystis* y otros mohos filamentosos como Mucorales, *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp., no se ha descrito algún biomarcador de diagnóstico específico, y los comercialmente disponibles para BG y GM, tienen un bajo rendimiento, y en la mayoría de los casos se obtienen resultados negativos en muestras de pacientes infectados con este tipo de hongos [92, 93].

2.4 Pruebas rápidas POC (*point-of-care*)

Actualmente, las pruebas rápidas POC (del inglés, *Point-of-care*), son consideradas como un método de diagnóstico alternativo para muchas enfermedades de importancia para el sector salud, debido a su fácil uso e interpretación, portabilidad y bajo costo de producción, comparado con otras pruebas de laboratorio comúnmente utilizadas [26-28]. Su principal objetivo es brindar

un resultado de diagnóstico confiable, rápido y justo en el punto de atención, bien sea una habitación de hospitalización, un consultorio o un área rural de difícil acceso.

Este tipo de pruebas se basa en el uso de biosensores capaces de traducir una interacción química, física o biológica en una señal medible, ya sea colorimétrica, luminiscente, de transducción electroquímica, entre otras. A la fecha, existen muchos tipos de biosensores capaces de detectar múltiples tipos de sustancias, moléculas, analitos o biomarcadores, y cada uno de estos presenta pros y contras en función de las necesidades propias de cada investigador. No obstante, los biosensores inmunocromatográficos de flujo lateral y los electroquímicos vienen siendo lo más recomendados teniendo en cuenta las condiciones de rendimiento, portabilidad y efectividad costo-tiempo que ofrecen. Actualmente, las pruebas de embarazo (biosensor inmunocromatográfico) y los glucómetros portátiles (biosensor electroquímico) son considerados como los biosensores de mayor éxito a nivel comercial [94-97].

2.4.1. Biosensores basados en inmunocromatografía

Este tipo de pruebas, consideradas como de interacción primaria y lectura rápida, vienen siendo aplicadas para la detección microbiológica de patógenos o sus derivados, drogas y otros analitos presentes en muestras biológicas, facilitando la toma de decisión inmediata sobre un problema específico [98]. Son también conocidos como ensayos de flujo lateral, porque implican el flujo de la muestra a través de una tira o membrana de material poroso, generalmente nitrocelulosa. El biomarcador, ya sea un antígeno, un anticuerpo o cualquier otro analito, en caso de estar presente en la muestra, fluye a través de la membrana y entra en contacto con unas moléculas de captura, generalmente anticuerpos específicos, presentes en la membrana y conjugados con nanopartículas de látex, oro coloidal o con nanotubos de carbono, que permitirán la posterior visualización una vez se haya dado la reacción y formación del complejo “*biomarcador-anticuerpo conjugado*”. Dicho complejo seguirá migrando a través de la membrana hasta la zona de detección, en la cual se encuentra inmovilizado un anticuerpo de captura también específico contra el biomarcador, que retendrá el complejo y por un ensayo tipo sándwich formará una banda coloreada, indicando la positividad de la prueba. Adicionalmente, al final de la membrana se ubicará un Anticuerpo-control que indicara que los reactivos fluyeron correctamente a través de la membrana, validando el resultado de la prueba [98, 99].

Actualmente, hay disponible en el mercado una prueba inmunocromatográfica para el diagnóstico de infección por *Cryptococcus* spp., conocida bajo el nombre *CrAg lateral-flow assay* (*CrAg-LFA*) y desarrollado por la marca IMMY Inc. (Immuno-Mycologies Inv., Norman, OK). Como prueba rápida, ha sido ampliamente utilizada en el ámbito clínico, dada las características de rendimiento que presenta (sensibilidad de 95-100%, especificidad 96-99%), su bajo costo y fácil uso, requiriendo un volumen de 40µl de la muestra, ya sea suero, orina o líquido cefalorraquídeo [100, 101]. Sin embargo, es importante mencionar que algunos estudios han reportado la presencia de falsos negativos con la prueba a causa de efectos de zona, particularmente en aquellos casos donde la cantidad de antígeno circulante en el paciente es muy alta (postzona) [102, 103].

Asimismo, existen reportes en la literatura sobre el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico rápido basadas en inmunocromatografía para algunos hongos de importancia médica como lo son *Aspergillus* spp., e *Histoplasma* spp. Para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva (AI), se ha descrito el desarrollo de una tirilla de flujo lateral con un anticuerpo monoclonal dirigido contra una glicoproteína extracelular de *Aspergillus*, siendo evaluada con muestras de lavado broncoalveolar y suero de pacientes con AI, con las cuales ha demostrado una sensibilidad entre 70% - 86%, y una especificidad del 87% [104-106].

Para el caso de la histoplasmosis, existen reportes sobre el desarrollo un ensayo de flujo lateral para la detección de un antígeno de *H. capsulatum* de la marca MiraVista® (MiraVista Diagnostics, Indianápolis, USA), el cual ha presentado una sensibilidad y especificidad del 96% y 90%-100% respectivamente, cuando es utilizado con muestras de suero y orina. Sin embargo, todas las muestras de suero debieron ser pretratadas, calentadas y centrifugadas, generando la necesidad de equipos especializados para su implementación [107, 108]. Adicionalmente, esta prueba aún no se encuentra disponible comercialmente para países fuera de los Estados Unidos [109, 110].

2.4.2. Biosensores electroquímicos

Los biosensores, cuya función es detectar una determinada sustancia, molécula o ion utilizando un bioreceptor anclado a un transductor, pueden ser categorizados según la molécula de reconocimiento como biosensores enzimáticos, inmunológicos, genómicos o basados en péptidos, aptámeros, entre otros [111, 112], o según el tipo de transductor utilizado como electroquímicos [113, 114], ópticos [115, 116], piezoeléctricos [117], termométricos [118] entre otros [119,120].

Para el caso de los biosensores electroquímicos, se utiliza una molécula de captura (receptor) anclada comúnmente a un transductor tipo electrodo integrado a un circuito eléctrico cerrado (o a otro tipo de soporte), capaz de detectar y traducir una señal de forma medible, generada por el cambio en las propiedades eléctricas del transductor o por el movimiento de electrones, a partir de los procesos de oxido-reducción en la superficie del transductor mediante una sonda electroquímica, en función de la cantidad de biomarcador presente en una muestra determinada [121].

Hoy en día, aunque la cantidad de biosensores disponibles a nivel comercial no es muy alta, el número de prototipos en fase de investigación sí es muy amplia [122, 123] y su aplicación ha podido extenderse en múltiples campos, al permitir la detección de una gran variedad de moléculas, siempre y cuando se logre definir el bioreceptor con la especificidad mínima requerida. Particularmente, los biosensores electroquímicos vienen siendo utilizados con mayor interés a nivel clínico, debido a las grandes ventajas que presentan en cuanto a costos de producción, portabilidad, estabilidad y rendimientos en términos de sensibilidad, mostrando en muchos casos una capacidad de detección a escala femtomolar en procesos de interacción antígeno-anticuerpo y DNA-DNA [121, 124].

Respecto a la aplicación de biosensores electroquímicos para el diagnóstico de infecciones fúngicas invasivas, existen algunos reportes de estudios sobre el desarrollo de dispositivos para la detección de levaduras de *Candida albicans* [125-128]. Uno de los primeros fue publicado en 1986 por Muramatsu y colaboradores [126], en el cual se desarrolló un inmunosensor piezoeléctrico con capacidad para detectar y cuantificar levaduras del hongo en un rango de 1×10^6 a 5×10^8 . Mas recientemente, Kwasny y colaboradores [127] publicaron en 2018 el desarrollo un sensor electroquímico capaz de detectar hasta 10UFC/ml de levaduras de *Candida albicans* aplicando un sistema de medición por impedancia electroquímica.

En el caso de la histoplasmosis, a la fecha no existen reportes relacionados con investigaciones enfocadas en el desarrollo de este tipo de dispositivos para la detección de *H. capsulatum*, ni su potencial utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Desarrollar una prueba rápida tipo biosensor de flujo lateral o electroquímico para el diagnóstico de infección por *Histoplasma capsulatum*

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Identificar nuevos biomarcadores de diagnóstico específicos para la infección por *H. capsulatum* aplicando un modelo de análisis computacional “pipeline”.

3.2.2. Comprobar los hallazgos bioinformáticos y generar un esquema de inmunización in vivo para obtener anticuerpos policlonales reactivos contra los biomarcadores seleccionados.

3.2.3. Establecer un esquema de validación de nuevos biomarcadores con potencial aplicación para el diagnóstico de la histoplasmosis, implementando técnicas experimentales de laboratorio.

3.2.4. Demostrar la interacción de los anticuerpos policlonales desarrollados frente a los antígenos de *H. capsulatum* mediante un prototipo beta de prueba rápida tipo POC.

4. Referencias

1. Gil N, Montenegro A. Análisis de Situación de Salud (ASIS) Colombia. Dirección de Epidemiología: Ministerio de Salud y Protección Social; 2021.
2. Montúfar Andrade F, Quiroga A, Builes C, Saldarriaga C, Aguilar C, Mesa M, et al. Epidemiología de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana en pacientes hospitalizados en una institución de alta complejidad y enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Infectio*. 2016;20(1):9-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.05.004>.
3. Spallone A, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35(2):261-77. Epub 2021/05/22. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.014. PubMed PMID: 34016278.
4. Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011;49(8):785-98. Epub 2011/05/05. doi: 10.3109/13693786.2011.577821. PubMed PMID: 21539506.
5. Forno D, Samayoa B, Medina N, Arathoon E, Mejia CR, Gordillo R, et al. Diagnosis of fungal opportunistic infections in people living with HIV from Guatemala and El Salvador. *Mycoses*. 2021;64(12):1563-70. Epub 2021/09/19. doi: 10.1111/myc.13368. PubMed PMID: 34536307; PubMed Central PMCID: PMC8781144.
6. Falci DR, Pasqualotto AC. Clinical mycology in Latin America and the Caribbean: A snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. *Mycoses*. 2019;62(4):368-73. Epub 2019/01/08. doi: 10.1111/myc.12890. PubMed PMID: 30614600.
7. Cano-Torres JO, Olmedo-Reneaum A, Esquivel-Sanchez JM, Camiro-Zuniga A, Perez-Carrisoza A, Madrigal-Iberri C, et al. Progressive disseminated histoplasmosis in Latin America and the Caribbean in people receiving highly active antiretroviral therapy for HIV infection: A systematic review. *Med Mycol*. 2019;57(7):791-9. Epub 2019/01/23. doi: 10.1093/mmy/myy143. PubMed PMID: 30668766.
8. Nacher M, Couppie P, Epelboin L, Djossou F, Demar M, Adenis A. Disseminated Histoplasmosis: Fighting a neglected killer of patients with advanced HIV disease in Latin America. *PLoS Pathog*. 2020;16(5):e1008449. Epub 2020/05/15. doi: 10.1371/journal.ppat.1008449. PubMed PMID: 32407383; PubMed Central PMCID: PMC7224450.

9. Agudelo-Gonzalez S, Murcia-Sanchez F, Salinas D, Osorio J. Infecciones oportunistas en pacientes con VIH en el hospital universitario de Neiva, Colombia. 2007-2012. *Infectio*. 2015;19:52-9.
10. Caceres DH, Zuluaga A, Arango-Bustamante K, de Bedout C, Tobon AM, Restrepo A, et al. Implementation of a Training Course Increased the Diagnosis of Histoplasmosis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(3):662-7. Epub 2015/07/01. doi: 10.4269/ajtmh.15-0108. PubMed PMID: 26123961; PubMed Central PMCID: PMC4559714.
11. Adenis AA, Valdes A, Cropet C, McCotter OZ, Derado G, Couppie P, et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(10):1150-9. Epub 2018/08/28. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30354-2. PubMed PMID: 30146320; PubMed Central PMCID: PMC6746313.
12. Arango M, Castañeda E, Agudelo CI, De Bedout C, Agudelo CA, Tobón A, et al. Histoplasmosis en Colombia: resultados de la encuesta nacional, 1992-2008. *Biomédica*. 2011;31(3):344-56. doi: 10.7705/biomedica.v31i3.348.
13. Nacher M, Valdes A, Adenis A, Blaizot R, Ugo F, Abboud P, et al. Review of diagnostic methods and results for HIV-associated disseminated histoplasmosis: Pathologists are not sufficiently involved. *Trop Med Int Health*. 2021;26(11):1462-9. Epub 2021/07/27. doi: 10.1111/tmi.13663. PubMed PMID: 34310800.
14. Hoffmann ER, Daboit TC, Paskulin DD, Monteiro AA, Falci DR, Linhares T, et al. Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicentre study to evaluate the performance of different diagnostic tests. *Mycoses*. 2017;60(1):20-4. Epub 2016/07/23. doi: 10.1111/myc.12536. PubMed PMID: 27443422.
15. Toscanini MA, Nusblat AD, Cuestas ML. Diagnosis of histoplasmosis: current status and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(5):1837-59. Epub 2021/02/16. doi: 10.1007/s00253-021-11170-9. PubMed PMID: 33587157.
16. Hage CA, Azar MM, Bahr N, Loyd J, Wheat LJ. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2015;36(5):729-45. Epub 2015/09/24. doi: 10.1055/s-0035-1562899. PubMed PMID: 26398539.

17. Muñoz CO, Cano LE, González A. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio*. 2010;14:s145-s58.
18. Fandino-Devia E, Rodriguez-Echeverri C, Cardona-Arias J, Gonzalez A. Antigen Detection in the Diagnosis of Histoplasmosis: A Meta-analysis of Diagnostic Performance. *Mycopathologia*. 2016;181(3-4):197-205. Epub 2015/11/13. doi: 10.1007/s11046-015-9965-3. PubMed PMID: 26559429.
19. Theel ES, Haring JA, Dababneh AS, Rollins LO, Bestrom JE, Jespersen DJ. Reevaluation of commercial reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in urine. *J Clin Microbiol*. 2015;53(4):1198-203. Epub 2015/01/30. doi: 10.1128/JCM.03175-14. PubMed PMID: 25631806; PubMed Central PMCID: PMC4365218.
20. Persaud SP, Lawton T, Burnham CD, Anderson NW. Comparison of Urine Antigen Assays for the Diagnosis of *Histoplasma capsulatum* Infection. *J Appl Lab Med*. 2019;4(3):370-82. Epub 2019/10/30. doi: 10.1373/jalm.2018.028910. PubMed PMID: 31659074.
21. Maphanga TG, Naicker SD, Gomez BL, Mhlanga M, Mpembe RS, Schwartz IS, et al. Cross-reactivity of a *Histoplasma capsulatum* antigen enzyme immunoassay in urine specimens from persons with emergomycosis in South Africa. *Med Mycol*. 2021;59(7):672-82. Epub 2020/12/18. doi: 10.1093/mmy/myaa100. PubMed PMID: 33330930.
22. Torres-Gonzalez P, Niembro-Ortega MD, Martinez-Gamboa A, Ahumada-Topete VH, Andrade-Villanueva J, Araujo-Melendez J, et al. Diagnostic accuracy cohort study and clinical value of the *Histoplasma* urine antigen (ALPHA *Histoplasma* EIA) for disseminated histoplasmosis among HIV infected patients: A multicenter study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):e0006872. Epub 2018/11/06. doi: 10.1371/journal.pntd.0006872. PubMed PMID: 30395572; PubMed Central PMCID: PMCPMC6237426.
23. Vasconcellos I, Dalla Lana DF, Pasqualotto AC. The Role of Molecular Tests in the Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis. *J Fungi (Basel)*. 2019;6(1). Epub 2019/12/22. doi: 10.3390/jof6010001. PubMed PMID: 31861302; PubMed Central PMCID: PMC7151051.
24. Munoz C, Gomez BL, Tobon A, Arango K, Restrepo A, Correa MM, et al. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin Vaccine Immunol*.

2010;17(1):62-7. Epub 2009/11/27. doi: 10.1128/CVI.00332-09. PubMed PMID: 19940044; PubMed Central PMCID: PMC2812102.

25. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1367-76. Epub 2019/12/06. doi: 10.1093/cid/ciz1008. PubMed PMID: 31802125; PubMed Central PMCID: PMC7486838.

26. Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, Raoult D. The Point-of-Care Laboratory in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):429-47. Epub 2016/04/01. doi: 10.1128/CMR.00090-15. PubMed PMID: 27029593; PubMed Central PMCID: PMC4861988.

27. Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med.* 2012;9(9):e1001306. Epub 2012/09/14. doi: 10.1371/journal.pmed.1001306. PubMed PMID: 22973183.

28. Weiner RG, Tyler JK. The impact of point-of-care testing on the diagnosis of infectious diseases. *MLO Med Lab Obs.* 2003;35(8):36-7. Epub 2003/08/29. PubMed PMID: 12942660.

29. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *J Clin Microbiol.* 1999;37(3):653-63. Epub 1999/02/13. doi: 10.1128/JCM.37.3.653-663.1999. PubMed PMID: 9986828; PubMed Central PMCID: PMC484508.

30. Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castaneda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol.* 2003;12(12):3383-401. Epub 2003/11/25. doi: 10.1046/j.1365-294x.2003.01995.x. PubMed PMID: 14629354.

31. Vite-Garin T, Estrada-Barcenas DA, Cifuentes J, Taylor ML. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):11-5. Epub 2013/11/21. doi: 10.1016/j.riam.2013.09.013. PubMed PMID: 24252830.

32. Bonifaz Trujillo JA. *Histoplasmosis. Micología médica básica, 5e.* New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.

33. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):807-25. Epub 2007/09/07. doi: 10.1086/521259. PubMed PMID: 17806045.
34. Caceres DH, Valdes A. Histoplasmosis and Tuberculosis Co-Occurrence in People with Advanced HIV. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(3). Epub 2019/08/14. doi: 10.3390/jof5030073. PubMed PMID: 31404979; PubMed Central PMCID: PMC6787747.
35. Goodwin RA, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in normal hosts. *Medicine (Baltimore)*. 1981;60(4):231-66. Epub 1981/07/01. doi: 10.1097/00005792-198107000-00001. PubMed PMID: 7017339.
36. Azar MM, Loyd JL, Relich RF, Wheat LJ, Hage CA. Current Concepts in the Epidemiology, Diagnosis, and Management of Histoplasmosis Syndromes. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;41(1):13-30. Epub 2020/01/31. doi: 10.1055/s-0039-1698429. PubMed PMID: 32000281.
37. Hernandez JM, Munoz-Cadavid CO, Hernandez DL, Montoya C, Gonzalez A. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in peripheral blood from a patient with ocular histoplasmosis syndrome. *Med Mycol*. 2012;50(2):202-6. Epub 2011/07/08. doi: 10.3109/13693786.2011.593050. PubMed PMID: 21732747.
38. Arauz AB, Papineni P. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2021;35(2):471-91. Epub 2021/05/22. doi: 10.1016/j.idc.2021.03.011. PubMed PMID: 34016287.
39. Ashraf N, Kubat RC, Poplin V, Adenis AA, Denning DW, Wright L, et al. Redrawing the Maps for Endemic Mycoses. *Mycopathologia*. 2020;185(5):843-65. Epub 2020/02/11. doi: 10.1007/s11046-020-00431-2. PubMed PMID: 32040709; PubMed Central PMCID: PMC7416457.
40. Adamian CMC, de Lima Mota MA, Martins AAF, Aragao MC, Carvalho MS, Meneses GC, et al. Progressive disseminated histoplasmosis in HIV-positive patients. *Int J STD AIDS*. 2022;33(6):544-53. Epub 2022/03/29. doi: 10.1177/09564624221076605. PubMed PMID: 35343333.
41. Azar MM, Hage CA. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1612-20. Epub 2017/03/10. doi: 10.1128/JCM.02430-16. PubMed PMID: 28275076; PubMed Central PMCID: PMC5442517.

42. Wheat LJ. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(11):1207-21. Epub 2006/10/20. doi: 10.1517/14712598.6.11.1207. PubMed PMID: 17049017.
43. Falci DR, Hoffmann ER, Paskulin DD, Pasqualotto AC. Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests. *Braz J Infect Dis.* 2017;21(1):7-11. Epub 2016/11/23. doi: 10.1016/j.bjid.2016.09.012. PubMed PMID: 27875685.
44. Connolly PA, Durkin MM, Lemonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. Detection of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(12):1587-91. Epub 2007/10/05. doi: 10.1128/CVI.00071-07. PubMed PMID: 17913863; PubMed Central PMCID: PMC2168386.
45. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA Histoplasma antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(6):802-3. Epub 2007/04/06. doi: 10.1128/CVI.00035-07. PubMed PMID: 17409220; PubMed Central PMCID: PMC1951085.
46. Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER. Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the quantitation of Histoplasma antigen in human urine samples. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(1):18-22. Epub 2007/06/21. doi: 10.1309/Q7879TYDW5D93QK7. PubMed PMID: 17580268.
47. Theel ES, Jespersen DJ, Harring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of Histoplasma capsulatum antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3555-9. Epub 2013/08/24. doi: 10.1128/JCM.01868-13. PubMed PMID: 23966508; PubMed Central PMCID: PMC3889733.
48. Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso IC, Severo LC. Cross-reactivity of Paracoccidioides brasiliensis, Histoplasma capsulatum, and Cryptococcus species in the commercial Platelia Aspergillus enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(1):132-3. Epub 2008/11/21. doi: 10.1128/CVI.00310-08. PubMed PMID: 19020109; PubMed Central PMCID: PMC2620656.
49. Ghorra N, Goushchi A, Konopnicki D, Libois A, Lagrou K, Wind A, et al. Disseminated histoplasmosis diagnosed by cross-reactivity with the Aspergillus galactomannan

antigen in an HIV-positive patient. *J Mycol Med.* 2022;32(2):101244. Epub 2022/01/23. doi: 10.1016/j.mycmed.2022.101244. PubMed PMID: 35065508.

50. Goncalves DS, Rodriguez de La Noval C, Ferreira MDS, Honorato L, Araujo GRS, Frases S, et al. Histoplasma capsulatum Glycans From Distinct Genotypes Share Structural and Serological Similarities to Cryptococcus neoformans Glucuronoxylomannan. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:565571. Epub 2021/02/16. doi: 10.3389/fcimb.2020.565571. PubMed PMID: 33585262; PubMed Central PMCID: PMC7874066.

51. Alvarado P, Perez-Rojas Y, Zambrano EA, Gonzatti MI, Roschman-Gonzalez A. Improved serodiagnosis of histoplasmosis by use of deglycosylated extracellular released antigens of Histoplasma capsulatum. *J Microbiol Methods.* 2020;175:105981. Epub 2020/06/15. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105981. PubMed PMID: 32534998.

52. Gomez LF, Torres IP, Jimenez AM, McEwen JG, de Bedout C, Pelaez CA, et al. 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. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(5):1303-12. Epub 2018/03/14. doi: 10.4269/ajtmh.17-0214. PubMed PMID: 29532772; PubMed Central PMCID: PMC5953352.

53. Lopez LF, Munoz CO, Caceres DH, Tobon AM, Loparev V, Clay O, et al. Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. *PLoS One.* 2017;12(12):e0190311. Epub 2017/12/30. doi: 10.1371/journal.pone.0190311. PubMed PMID: 29287097; PubMed Central PMCID: PMC5747470.

54. Muraosa Y, Toyotome T, Yahiro M, Watanabe A, Shikanai-Yasuda MA, Kamei K. Detection of Histoplasma capsulatum from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR. *Med Mycol.* 2016;54(4):433-8. Epub 2015/12/27. doi: 10.1093/mmy/myv106. PubMed PMID: 26705837.

55. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):490-526. Epub 2014/07/02. doi: 10.1128/CMR.00091-13. PubMed PMID: 24982319; PubMed Central PMCID: PMC4135902.

56. Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ*. 2002;324(7344):1018-22. Epub 2002/04/27. doi: 10.1136/bmj.324.7344.1018. PubMed PMID: 11976246; PubMed Central PMCID: PMC1122955.

57. Branco I, Choupina A. Bioinformatics: new tools and applications in life science and personalized medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105(3):937-51. Epub 2021/01/07. doi: 10.1007/s00253-020-11056-2. PubMed PMID: 33404829.

58. Orlov YL, Baranova AV, Tatarinova TV. Bioinformatics Methods in Medical Genetics and Genomics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17). Epub 2020/09/03. doi: 10.3390/ijms21176224. PubMed PMID: 32872128; PubMed Central PMCID: PMC7504073.

59. Promponas VJ, Ouzounis CA, Iliopoulos I. Experimental evidence validating the computational inference of functional associations from gene fusion events: a critical survey. *Brief Bioinform*. 2014;15(3):443-54. Epub 2012/12/12. doi: 10.1093/bib/bbs072. PubMed PMID: 23220349; PubMed Central PMCID: PMC4017328.

60. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med*. 2020;9(1). Epub 2020/01/18. doi: 10.3390/jcm9010132. PubMed PMID: 31947757; PubMed Central PMCID: PMC7019349.

61. Almeida OGG, De Martinis ECP. Bioinformatics tools to assess metagenomic data for applied microbiology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(1):69-82. Epub 2018/10/27. doi: 10.1007/s00253-018-9464-9. PubMed PMID: 30362076.

62. Koonin EV. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet*. 2005;39:309-38. Epub 2005/11/16. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.114725. PubMed PMID: 16285863.

63. Altenhoff AM, Glover NM, Dessimoz C. Inferring Orthology and Paralogy. *Methods Mol Biol*. 2019;1910:149-75. Epub 2019/07/07. doi: 10.1007/978-1-4939-9074-0_5. PubMed PMID: 31278664.

64. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W5-9. Epub 2008/04/29. doi: 10.1093/nar/gkn201. PubMed PMID: 18440982; PubMed Central PMCID: PMC2447716.

65. Madden T. Chapter 16. The BLAST Sequence Analysis Tool. In: McEntyre J OJ, editor. *The NCBI Handbook* [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/2003>.

66. Gabaldon T, Koonin EV. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nat Rev Genet.* 2013;14(5):360-6. Epub 2013/04/05. doi: 10.1038/nrg3456. PubMed PMID: 23552219; PubMed Central PMCID: PMC5877793.

67. Moreira D, López-García P. Paralogous Gene. In: Gargaud M, Amils R, Quintanilla JC, Cleaves HJ, Irvine WM, Pinti DL, et al., editors. *Encyclopedia of Astrobiology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 1215-.

68. Kuzniar A, van Ham RC, Pongor S, Leunissen JA. The quest for orthologs: finding the corresponding gene across genomes. *Trends Genet.* 2008;24(11):539-51. Epub 2008/09/30. doi: 10.1016/j.tig.2008.08.009. PubMed PMID: 18819722.

69. Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science.* 1997;278(5338):631-7. Epub 1997/10/24. doi: 10.1126/science.278.5338.631. PubMed PMID: 9381173.

70. Galperin MY, Wolf YI, Makarova KS, Vera Alvarez R, Landsman D, Koonin EV. COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D274-D81. Epub 2020/11/10. doi: 10.1093/nar/gkaa1018. PubMed PMID: 33167031; PubMed Central PMCID: PMC7778934.

71. Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics.* 2003;4:41. Epub 2003/09/13. doi: 10.1186/1471-2105-4-41. PubMed PMID: 12969510; PubMed Central PMCID: PMC222959.

72. Nichio BTL, Marchaukoski JN, Raittz RT. New Tools in Orthology Analysis: A Brief Review of Promising Perspectives. *Front Genet.* 2017;8:165. Epub 2017/11/23. doi: 10.3389/fgene.2017.00165. PubMed PMID: 29163633; PubMed Central PMCID: PMC5674930.

73. O'Brien KP, Remm M, Sonnhammer EL. Inparanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D476-80. Epub 2004/12/21. doi: 10.1093/nar/gki107. PubMed PMID: 15608241; PubMed Central PMCID: PMC540061.

74. Remm M, Storm CE, Sonnhammer EL. Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol.* 2001;314(5):1041-52. Epub 2001/12/18. doi: 10.1006/jmbi.2000.5197. PubMed PMID: 11743721.

75. Li L, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 2003;13(9):2178-89. Epub 2003/09/04. doi: 10.1101/gr.1224503. PubMed PMID: 12952885; PubMed Central PMCID: PMC403725.

76. Fouts DE, Brinkac L, Beck E, Inman J, Sutton G. PanOCT: automated clustering of orthologs using conserved gene neighborhood for pan-genomic analysis of bacterial strains and closely related species. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(22):e172. Epub 2012/08/21. doi: 10.1093/nar/gks757. PubMed PMID: 22904089; PubMed Central PMCID: PMC3526259.

77. Van Dongen S. Graph Clustering Via a Discrete Uncoupling Process. *SIAM Journal on Matrix Analysis and Applications.* 2008;30(1):121-41. doi: 10.1137/040608635.

78. Campbell SE, Williams TA, Yousuf A, Soanes DM, Paszkiewicz KH, Williams BA. The genome of *Spraguea lophii* and the basis of host-microsporidian interactions. *PLoS Genet.* 2013;9(8):e1003676. Epub 2013/08/31. doi: 10.1371/journal.pgen.1003676. PubMed PMID: 23990793; PubMed Central PMCID: PMC3749934.

79. Danchin EG, Arguel MJ, Campan-Fournier A, Perfus-Barbeoch L, Magliano M, Rosso MN, et al. Identification of novel target genes for safer and more specific control of root-knot nematodes from a pan-genome mining. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003745. Epub 2013/11/10. doi: 10.1371/journal.ppat.1003745. PubMed PMID: 24204279; PubMed Central PMCID: PMC3814813.

80. Okagaki LH, Sailsbery JK, Eyre AW, Dean RA. Comparative genome analysis and genome evolution of members of the magnaporthaceae family of fungi. *BMC Genomics.* 2016;17:135. Epub 2016/02/26. doi: 10.1186/s12864-016-2491-y. PubMed PMID: 26911875; PubMed Central PMCID: PMC4766678.

81. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD)2016.

82. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(3):213-21. Epub 2018/02/07. doi: 10.1177/1535370217750088. PubMed PMID: 29405771; PubMed Central PMCID: PMC5813875.

83. Srinitha B. Biomarkers and Disease Diagnosis. *Prim Health Care.* 2021;11(4):375. doi: 10.35248/2167-1079.21.11.375.

84. Bouza E, Almirante B, Garcia Rodriguez J, Garnacho-Montero J, Salavert M, Munoz P, et al. Biomarkers of fungal infection: Expert opinion on the current situation. *Rev Esp*

Quimioter. 2020;33(1):1-10. Epub 2019/11/16. doi: 10.37201/req/2260.2019. PubMed PMID: 31729203; PubMed Central PMCID: PMC6987620.

85. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* 2012;54(5):633-43. Epub 2011/12/27. doi: 10.1093/cid/cir897. PubMed PMID: 22198786.

86. Nogueira F, Istel F, Pereira L, Tscherner M, Kuchler K. Immunological Identification of Fungal Species. *Methods Mol Biol.* 2017;1508:339-59. Epub 2016/11/12. doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1_20. PubMed PMID: 27837515.

87. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004;39(2):199-205. Epub 2004/08/13. doi: 10.1086/421944. PubMed PMID: 15307029.

88. Tissot F, Lamoth F, Hauser PM, Orasch C, Fluckiger U, Siegemund M, et al. beta-glucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(9):1100-9. Epub 2013/06/21. doi: 10.1164/rccm.201211-2069OC. PubMed PMID: 23782027.

89. Engel J, Schmalhorst PS, Routier FH. Biosynthesis of the fungal cell wall polysaccharide galactomannan requires intraluminal GDP-mannose. *J Biol Chem.* 2012;287(53):44418-24. Epub 2012/11/10. doi: 10.1074/jbc.M112.398321. PubMed PMID: 23139423; PubMed Central PMCID: PMC3531755.

90. Patterson TF, Donnelly JP. New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies. *J Fungi (Basel).* 2019;5(1). Epub 2019/01/20. doi: 10.3390/jof5010009. PubMed PMID: 30658509; PubMed Central PMCID: PMC6463019.

91. Kandaurava S, Tchernovetski M, Aleinikova O. The use of biomarkers in the diagnostics of fungal infections complications in children with oncological and hematological diseases. *Journal of Microbiology & Experimentation.* 2021;9(4):8. doi: 10.15406/jmen.2021.09.00334.

92. Thompson GR, 3rd, Boulware DR, Bahr NC, Clancy CJ, Harrison TS, Kauffman CA, et al. Noninvasive Testing and Surrogate Markers in Invasive Fungal Diseases. *Open Forum Infect Dis.* 2022;9(6):ofac112. Epub 2022/05/26. doi: 10.1093/ofid/ofac112. PubMed PMID: 35611348; PubMed Central PMCID: PMC9124589.
93. Foppiano Palacios C, Spichler Moffarah A. Diagnosis of Pneumonia Due to Invasive Molds. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(7). Epub 2021/08/08. doi: 10.3390/diagnostics11071226. PubMed PMID: 34359309; PubMed Central PMCID: PMC9124589.
94. Ferreira CES, Guerra JCC, Shlessarenko N, Scartezini M, Franca CN, Colombini MP, et al. Point-of-Care Testing: General Aspects. *Clin Lab.* 2018;64(1):1-9. Epub 2018/02/27. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170730. PubMed PMID: 29479878.
95. Goble JA, Rocafort PT. Point-of-Care Testing. *J Pharm Pract.* 2017;30(2):229-37. Epub 2015/06/21. doi: 10.1177/0897190015587696. PubMed PMID: 26092752.
96. Wu J, Liu H, Chen W, Ma B, Ju H. Device integration of electrochemical biosensors. *Nat Rev Bioeng.* 2023;1(5):346-60. Epub 2023/05/12. doi: 10.1038/s44222-023-00032-w. PubMed PMID: 37168735; PubMed Central PMCID: PMC9951169.
97. Yoo EH, Lee SY. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel).* 2010;10(5):4558-76. Epub 2010/01/01. doi: 10.3390/s100504558. PubMed PMID: 22399892; PubMed Central PMCID: PMC3292132.
98. Sajid M, Kawde A-N, Daud M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society.* 2015;19(6):689-705. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.09.001>.
99. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016;60(1):111-20. Epub 2016/07/02. doi: 10.1042/EBC20150012. PubMed PMID: 27365041; PubMed Central PMCID: PMC4986465.
100. Escandon P, Lizarazo J, Agudelo CI, Chiller T, Castaneda E. Evaluation of a rapid lateral flow immunoassay for the detection of cryptococcal antigen for the early diagnosis of cryptococcosis in HIV patients in Colombia. *Med Mycol.* 2013;51(7):765-8. Epub 2013/04/25. doi: 10.3109/13693786.2013.781692. PubMed PMID: 23611420.
101. Lindsley MD, Mekha N, Baggett HC, Surinthong Y, Autthateinchai R, Sawatwong P, et al. Evaluation of a newly developed lateral flow immunoassay for the diagnosis of

cryptococcosis. *Clin Infect Dis*. 2011;53(4):321-5. Epub 2011/08/04. doi: 10.1093/cid/cir379. PubMed PMID: 21810743; PubMed Central PMCID: PMC3148258.

102. Borges M, Araujo Filho JA, Soares RBA, Vidal JE, Turchi MD. False-negative result of serum cryptococcal antigen lateral flow assay in an HIV-infected patient with culture-proven cryptococcaemia. *Med Mycol Case Rep*. 2019;26:64-6. Epub 2019/11/19. doi: 10.1016/j.mmcr.2019.10.009. PubMed PMID: 31737475; PubMed Central PMCID: PMC6849355.

103. Xu Y, Xia W, Ni F. False-Negative Serum Cryptococcal Antigen Lateral Flow Immunoassay Result for a Patient with Disseminated Cryptococcal Disease. *Infect Drug Resist*. 2020;13:2877-81. Epub 2020/09/10. doi: 10.2147/IDR.S265784. PubMed PMID: 32903771; PubMed Central PMCID: PMC7445500.

104. Prattes J, Heldt S, Eigl S, Hoenigl M. Point of Care Testing for the Diagnosis of Fungal Infections: Are We There Yet? *Curr Fungal Infect Rep*. 2016;10:43-50. Epub 2016/07/01. doi: 10.1007/s12281-016-0254-5. PubMed PMID: 27358661; PubMed Central PMCID: PMC4896970.

105. Thornton C, Johnson G, Agrawal S. Detection of invasive pulmonary aspergillosis in haematological malignancy patients by using lateral-flow technology. *J Vis Exp*. 2012;(61). Epub 2012/04/05. doi: 10.3791/3721. PubMed PMID: 22473419; PubMed Central PMCID: PMC3460586.

106. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(7):1095-105. Epub 2008/05/09. doi: 10.1128/CVI.00068-08. PubMed PMID: 18463222; PubMed Central PMCID: PMC2446636.

107. Myint T, Leedy N, Villacorta Cari E, Wheat LJ. HIV-Associated Histoplasmosis: Current Perspectives. *HIV AIDS (Auckl)*. 2020;12:113-25. Epub 2020/04/08. doi: 10.2147/HIV.S185631. PubMed PMID: 32256121; PubMed Central PMCID: PMC7090190.

108. Osaigbovo, II, Bongomin F. Point of care tests for invasive fungal infections: a blueprint for increasing availability in Africa. *Ther Adv Infect Dis*. 2021;8:20499361211034266. Epub 2021/08/24. doi: 10.1177/20499361211034266. PubMed PMID: 34422265; PubMed Central PMCID: PMC8371725.

109. Caceres DH, Gomez BL, Tobon AM, Chiller TM, Lindsley MD. Evaluation of a Histoplasma antigen lateral flow assay for the rapid diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in Colombian patients with AIDS. *Mycoses*. 2020;63(2):139-44. Epub 2019/10/19. doi: 10.1111/myc.13023. PubMed PMID: 31625627.
110. Caceres DH, Gomez BL, Tobon AM, Minderman M, Bridges N, Chiller T, et al. Validation and Concordance Analysis of a New Lateral Flow Assay for Detection of Histoplasma Antigen in Urine. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(10). Epub 2021/10/24. doi: 10.3390/jof7100799. PubMed PMID: 34682221; PubMed Central PMCID: PMCPCMC8539568.
111. Song S, Xu H, Fan C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(4):433-40. Epub 2007/08/28. doi: 10.2147/nano.2006.1.4.433. PubMed PMID: 17722277; PubMed Central PMCID: PMCPCMC2676639.
112. Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*. 2001;16(1-2):121-31. Epub 2001/03/23. doi: 10.1016/s0956-5663(01)00115-4. PubMed PMID: 11261847.
113. Fan C, Plaxco KW, Heeger AJ. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(16):9134-7. Epub 2003/07/18. doi: 10.1073/pnas.1633515100. PubMed PMID: 12867594; PubMed Central PMCID: PMCPCMC170884.
114. Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*. 2002;295(5559):1503-6. Epub 2002/02/23. doi: 10.1126/science.1067003. PubMed PMID: 11859188.
115. Gaylord BS, Heeger AJ, Bazan GC. DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):10954-7. Epub 2002/08/09. doi: 10.1073/pnas.162375999. PubMed PMID: 12167673; PubMed Central PMCID: PMCPCMC123191.
116. Xu H, Wu H, Huang F, Song S, Li W, Cao Y, et al. Magnetically assisted DNA assays: high selectivity using conjugated polymers for amplified fluorescent transduction. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(9):e83. Epub 2005/05/21. doi: 10.1093/nar/gni084. PubMed PMID: 15905472; PubMed Central PMCID: PMCPCMC1131937.

117. Cooper MA, Dultsev FN, Minson T, Ostanin VP, Abell C, Klenerman D. Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. *Nat Biotechnol.* 2001;19(9):833-7. Epub 2001/09/05. doi: 10.1038/nbt0901-833. PubMed PMID: 11533641.

118. Zhou S, Zhao Y, Mecklenburg M, Yang D, Xie B. A novel thermometric biosensor for fast surveillance of beta-lactamase activity in milk. *Biosens Bioelectron.* 2013;49:99-104. Epub 2013/06/01. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.005. PubMed PMID: 23722048.

119. Singh S, Kumar V, Dhanjal DS, Datta S, Prasad R, Singh J. Biological Biosensors for Monitoring and Diagnosis. *Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications.* 2020:317-35. doi: 10.1007/978-981-15-2817-0_14. PubMed Central PMCID: PMC7340096.

120. Naresh V, Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel).* 2021;21(4). Epub 2021/02/11. doi: 10.3390/s21041109. PubMed PMID: 33562639; PubMed Central PMCID: PMC7915135.

121. Banakar M, Hamidi M, Khurshid Z, Zafar MS, Sapkota J, Azizian R, et al. Electrochemical Biosensors for Pathogen Detection: An Updated Review. *Biosensors (Basel).* 2022;12(11). Epub 2022/11/11. doi: 10.3390/bios12110927. PubMed PMID: 36354437; PubMed Central PMCID: PMC9688024.

122. Ozsoylu D, Wagner T, Schoning MJ. Electrochemical Cell-based Biosensors for Biomedical Applications. *Curr Top Med Chem.* 2022;22(9):713-33. Epub 2022/03/08. doi: 10.2174/1568026622666220304213617. PubMed PMID: 35249491.

123. Felix FS, Angnes L. Electrochemical immunosensors - A powerful tool for analytical applications. *Biosens Bioelectron.* 2018;102:470-8. Epub 2017/11/29. doi: 10.1016/j.bios.2017.11.029. PubMed PMID: 29182930.

124. Gebretsadik T, Belayneh T, Gebremichael S, Linert W, Thomas M, Berhanu T. Recent advances in and potential utilities of paper-based electrochemical sensors: beyond qualitative analysis. *Analyst.* 2019;144(8):2467-79. Epub 2019/03/19. doi: 10.1039/c8an02463d. PubMed PMID: 30882804.

125. Nugaeva N, Gfeller KY, Backmann N, Lang HP, Duggelin M, Hegner M. Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosens Bioelectron.* 2005;21(6):849-56. Epub 2005/11/01. doi: 10.1016/j.bios.2005.02.004. PubMed PMID: 16257652.

126. Muramatsu H, Kajiwara K, Tamiya E, Karube I. Piezoelectric immuno sensor for the detection of candida albicans microbes. *Analytica Chimica Acta*. 1986;188:257-61. doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86049-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86049-3).

127. Kwasny D, Tehrani SE, Almeida C, Schjodt I, Dimaki M, Svendsen WE. Direct Detection of Candida albicans with a Membrane Based Electrochemical Impedance Spectroscopy Sensor. *Sensors (Basel)*. 2018;18(7). Epub 2018/07/13. doi: 10.3390/s18072214. PubMed PMID: 29996525; PubMed Central PMCID: PMC6069365.

128. Villamizar RA, Maroto A, Rius FX. Improved detection of Candida albicans with carbon nanotube field-effect transistors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009;136(2):451-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.10.013>.

CAPÍTULO II.

Este capítulo incluye la metodología y los resultados relacionados con los objetivos específicos:

3.2.1. Identificar nuevos biomarcadores de diagnóstico específicos para la infección por *H. capsulatum* aplicando un modelo de análisis computacional “*pipeline*”.

3.2.2. Comprobar los hallazgos bioinformáticos y generar un esquema de inmunización *in vivo* para obtener anticuerpos policlonales reactivos contra los biomarcadores seleccionados.

3.2.3. Establecer un esquema de validación de nuevos biomarcadores con potencial aplicación para el diagnóstico de la histoplasmosis, implementando técnicas experimentales de laboratorio.

Los resultados obtenidos en este capítulo corresponden al manuscrito titulado ***Identification and production of novel potential pathogen-specific biomarkers for diagnosis of histoplasmosis*** (aprobado, revista *Microbiology spectrum*, Código *Spectrum00939-23*), siendo presentado como parte del documento de tesis, a continuación:

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Identification and production of novel potential pathogen-specific biomarkers for diagnosis of histoplasmosis

Short running title: Identification of novel diagnostic biomarkers for histoplasmosis

Authors:

Juan David Puerta-Arias^{1,2,3,A}, Juan Pablo Isaza Agudelo^{2,B}, Tonny Williams Naranjo Preciado^{1,2,C}

1. Medical and Experimental Mycology Group, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB-UdeA-UPB-UNDES), Medellín, Colombia
2. School of Health Sciences, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.
3. Infectious Disease Research Program, Faculty of Medical and Health Sciences, Universidad de Santander, Medellín, Colombia

A) jpuerta@cib.org.co; <https://orcid.org/0000-0001-6000-2348>

B) juan.isazaa@upb.edu.co; <https://orcid.org/0000-0002-7551-057X>

C) tonny.naranjo@upb.edu.co; <https://orcid.org/0000-0003-4667-6391>

Correspondence author

Juan David Puerta Arias. MSc, Medical and Experimental Mycology Group, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB-UdeA-UPB-UNDES), Medellín, Colombia.

E-mail address: jpuerta@cib.org.co

Fax number: 57(604) 6051808

ABSTRACT

The immunological assays based on the detection of circulating fungal biomarkers are helpful in clinical practice for diagnosing of invasive fungal infections. Some of these targeting antigenic components are common to several different fungi.

Histoplasmosis is a mycosis caused by the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, which in recent years has gained significant relevance due to the increase in the population susceptible to developing severe clinical forms, including those living with HIV / AIDS. Immunological tests that detect cell wall polysaccharide antigens are among the most used laboratory techniques for diagnosing this mycosis. However, none have shown adequate performance, and cross-reactivity with other fungal pathogens may be observed.

Considering that there is a real need to improve the sensitivity and specificity of current diagnostic methods, we explored a novel strategy for the identification of *H. capsulatum*- specific antigens (*Hc_Ags*) that could be detected in clinical samples during infection based on a computational analysis model that included the application of bioinformatics tools and the analysis of experimental data from transcriptomics and proteomics.

First, the *Hc_Ags* identified were expressed and purified by eukaryotic and prokaryote systems. Then, these were used in an in-house immunization model in mice (BALB/c) to obtain *Hc_Ag*-specific polyclonal antibodies (*Hc_Ag_PAb*). Then, it was confirmed the presence of these antigens in *H. capsulatum*-yeast culture extracts and the specificity of *Hc_Ag_PAb* against culture extracts of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Finally, we demonstrated the immunoreactivity of these *Hc_Ag*-specific polyclonal antibodies with urine-samples from patients previously diagnosed with histoplasmosis.

Keywords:

Histoplasmosis, biomarkers, fungal antigens

INTRODUCTION

Currently, immunological techniques based on the antigen-antibody reaction are widely used in routine laboratories to diagnose multiple infectious diseases. The capacity of these methods to detect specific circulating antimicrobial antigens directly from clinical samples can lead to rapid diagnosis and effective treatment in the patients (1).

In the case of fungal infections, many immunodiagnostic tests have been developed based on the detection of cell wall components, mainly polysaccharides such as 1,3 beta-D-glucan and galactomannan, which are present in spores, hyphal filaments, or yeast-like cells (2). However, since several of these surface antigens are ubiquitous to a broad spectrum of fungal species, false-positive results are typical, causing difficulties differentiating the correct pathogenic fungus (3).

This study focuses on the thermally dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, the causal agent of histoplasmosis. This mycosis, highly endemic in American countries, affects people with impaired immunity, especially those living with HIV / AIDS (4-6). Currently, several conventional laboratory methods are developed for diagnosing this fungal infection, including culture, histopathology, and immunological and molecular tests. However, the performance of these methods often depends on the clinical form (acute or chronic infection), the patient's immune status, or the laboratory's mycological expertise (7-9). Regarding the immunological tests developed for the diagnosis of histoplasmosis, few laboratories offer detection services for *Histoplasma* circulating antigen, and some are not available for Latin American countries (10-15). Additionally, these tests, including the most widely used, such as the *Histoplasma-polysaccharide* antigen enzyme-linked Immunoassay (EIA) developed by *MiraVista Diagnostics* (Indianapolis, USA) (16) and the commercial EIA test designed by *IMMY company* (Immuno-Mycologics, IMMY, Norman, OK, USA) to detect *Histoplasma*-galactomannan antigen (11), have reported a variable analytical sensibility (40% to 86%) and cross-reactivity in samples from patients with other fungal infections, including blastomycosis, coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis, penicilliosis, cryptococcosis, aspergillosis, sporotrichosis and emergomycosis (16-22).

Considering that treatments may differ between certain fungi or not be effective, it is imperative to design new diagnostic tools with greater specificity and suitable for conventional laboratories of endemic countries (23, 24). Furthermore, the main challenge is to identify which microbial products the fungus produced during infection could be used as potential antigen targets for immunoassays. However, few studies focused on identifying new potential biomarkers that

may be useful not only for immunodiagnosis but also for monitoring the effectiveness of treatment in fungal infections such as histoplasmosis.

Here, we design a new strategy that integrates the use of computational tools, such as OrthoMCL (25), BLASTp (26, 27), TargetP (28), and SignalP (29), applied on a local collection of proteome database obtained manually from GenBank-NCBI, and the analysis of previously published biological and experimental data sets (omics data [genomics, transcriptomics, and proteomics]) (30) applied to the search, selection, and production of potential biomarkers for the immunodiagnostic of histoplasmosis.

The *Histoplasma* antigens described in this study could serve as proof of principle for new diagnostic tools based on immunological methods. Furthermore, our results showed that this novel strategy is a means for identifying specific biomarkers for immunoassays and could be applied to other infection models.

RESULTS

Analysis of orthologous proteins

Comparative analysis of 343.723 proteins obtained from 33 proteomes of fungi species and 2 proteomes of *M. tuberculosis* was performed using the OrthoMCL algorithm (Table 1).

Table 1. Fungal and bacteria strains proteomes used in the analysis

Taxonomy name (code)*	strain	Total length (Mbp)	Number proteins
<i>Histoplasma capsulatum</i> (Hc)	G186A	30	9254
	H88	37	9445
	H143	38	9547
	Nam1	33	9313
<i>Emmonsia parva</i> (Ep)	UAMH139	30	9562
<i>Emmonsia crescens</i> (Ec)	UAMH3008	30	9444
<i>Blastomyces dermatitidis</i> (Bd)	ATCC18188	73	11443
<i>Blastomyces percursus</i> (Bp)	EI222	32	10285
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (Pb)	03	29	8427
	18	29	8390
<i>Paracoccidioides lutzii</i> (Pl)	01	32	8826
<i>Coccidioides immitis</i> (Ci)	RMSCC2394	28	10593
<i>Coccidioides posadasii</i> (Cp)	RMSCC3488	28	9964
<i>Candida albicans</i> (Ca)	SC5314	14	6030
	WO-1	14	5752
<i>Candida tropicalis</i> (Ct)	MYA3404	14	6254
<i>Candida parapsilosis</i> (Cpa)	CDC317	13	5810
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (Cnn)	JEC21	19	6475
	B3501A	19	13156
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> (Cng)	H99	18	7826
<i>Cryptococcus gatti</i> (Cg)	WM276	18	6561
	2001/935-1	17	6495
	CA1873	17	6634
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (Pj)	RU7	8	3761

<i>Aspergillus fumigatus (Afu)</i>	Af293	29	19260
<i>Aspergillus niger (An)</i>	FDAARGOS311	35	11190
<i>Aspergillus flavus (Afl)</i>	NRRL3357	36	13485
<i>Aspergillus terreus (At)</i>	NIH2624	29	10401
<i>Talaromyces marneffeii (Tm)</i>	ATCC18224	28	10638
<i>Fusarium oxysporum (Fo)</i>	4287	61	27347
	Forc016	52	17168
<i>Fusarium proliferatum (Fp)</i>	ET1	44	14819
<i>Schizophyllum commune (Sc)</i>	H48	38	13194
	H37Rv	4.4	3906
<i>Mycobacterium tuberculosis (Mt)</i>	CDC1551	4.4	4068
TOTAL	35 proteomes		343.723

* Code defined by author

Of the 25.770 OrthoMCL protein clusters obtained, 1.851 (7%) contained at least one protein from each species included in the analysis. Not surprisingly, these proteins are involved in central biological processes, including cell cycle regulation, transport, cytoskeletal organization, or as surface antigens (data no shown). Further exploration of datasets showed that most clusters contained between two and nine proteins (n=19.618 clusters, 76%), and only a group of 5 clusters included more than 1000 predicted orthologous genes (Table 2).

Table 2. Total number of genes per cluster

Table 2. Total number of genes per cluster		
Number genes	Number clusters	%
2428	1	0.004%
> 1000	4	0.016%
501 - 1000	18	0.07%
300 - 500	18	0.07%
200 - 299	36	0.14%
100 - 199	134	0.52%

10 – 99	5941	23%
2 – 9	19618	76%

For each fungi specie, the clusters with at least one protein, the clusters with in-paralogous proteins, and the total number of singleton proteins are presented in figure 1. Interestingly, *H. capsulatum* presented a group of 1.567 protein clusters containing a total of 3.572 in-paralogous proteins, and 3.230 singletons (single-copy) proteins, considered as unique or specific to this fungus by OrthoMCL. A total of 6.802 *Hc-proteins* were selected for the subsequent analysis.

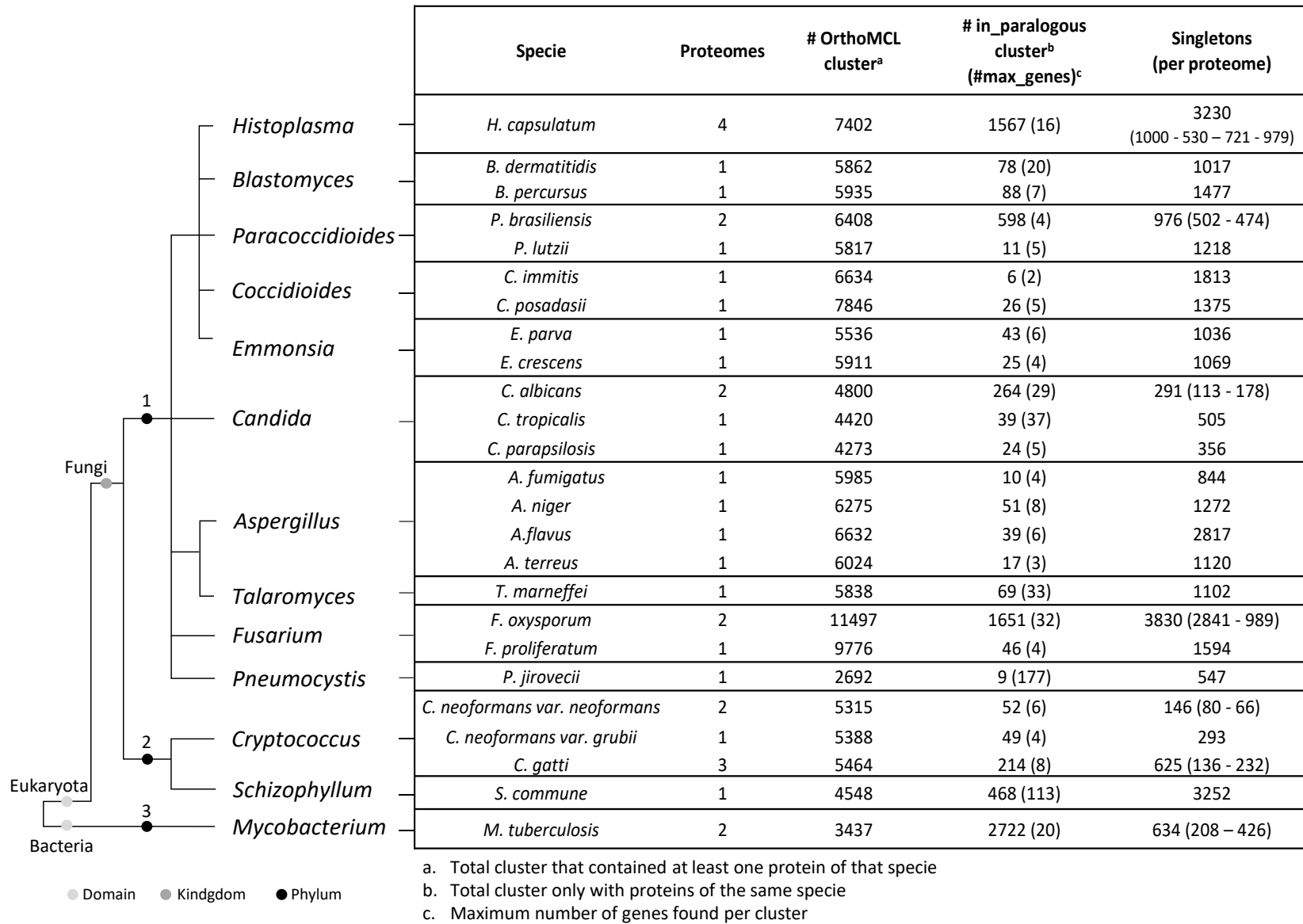


Figure 1. Descriptive analysis of OrthoMCL clusters. A non-statistical cladogram is collapsed, showing the relationships and taxonomic classification among the fungal species included in the analysis. The number indicates the phylum; 1) *Ascomycota*, 2) *Basidiomycota* and 3) *Actinobacteria*. On the right-hand side, the table compares the number of gene families identified by OrthoMCL by each species.

Identification of potential biomarkers

We designed a strategy to find those proteins, specific to *H. capsulatum* that can serve as potential biomarkers for diagnosis. The overall analysis pipeline is illustrated in Figure 2.

Following OrthoMCL analysis, the first step was to perform a subcellular localization prediction with TargetP and SignalP to detect those proteins of *H. capsulatum* that have a signal peptide (SP) in the N-terminal. The SP is responsible for transporting proteins to the endoplasmic reticulum (ER) to enter the secretory pathway. Therefore, the presence of an SP in a protein is considered the signature of a secretory protein. SignalP output revealed 176 genes (101 in-paralogous and 75 singletons) predicted to be classically secreted proteins. In contrast, TargetP predicted 108 proteins that contained secretory pathway signal peptides (56 in-paralogous and 52 singletons). Only proteins predicted by both programs were selected to confirm the analysis further. A total of 57 *Hc-proteins* were identified as putative secreted proteins (34 in-paralogous and 23 singletons). (Figure 2)

Then, all predicted secreted *Hc-proteins* were blasted against the NCBI non-redundant (nr) database by BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool protein) to search for similar proteins from other species that were not included in the initial OrthoMCL analysis. It was found that only 3 proteins (in-paralogous) shared similarities with other fungal proteins of the nr_NCBI database with a percent match <30% (data not shown). Finally, a total of 54 proteins (31 in-paralogous and 23 singletons) were considered specific to *H. capsulatum* (Figure 2).

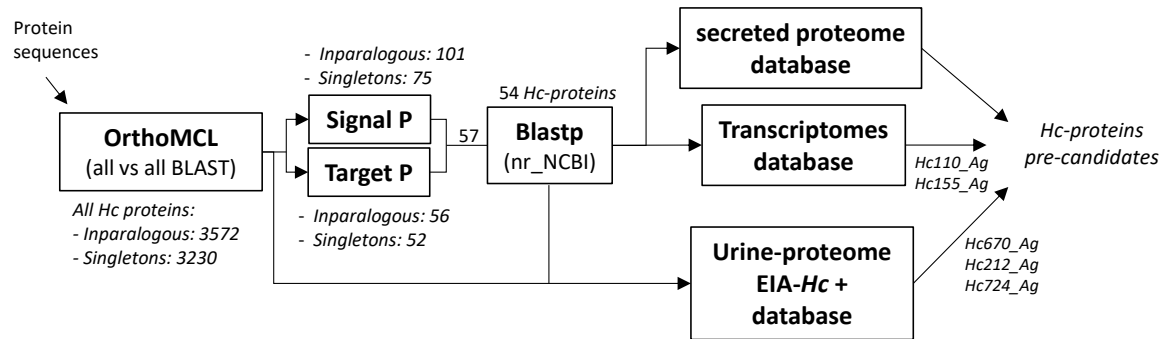


Figure 2. Flowchart of the analysis pipeline. Overview of the workflow of bioinformatic analysis system used to identify *H. capsulatum*-specific gene as a potential biomarkers diagnosis of Histoplasmosis. For each analysis step, the information obtained is shown. (nr_NCBI) indicates the BLAST analysis against the nr database compiled by NCBI. *Secreted proteome database*, *Transcriptomes database*, and *Urine-proteome EIA-Hc+* database indicate the comparative analysis against the database previously published by Holbrook. (31), Edwards et al (32) and Crockett. (33), respectively.

As a final step, we analyzed previously published experimental datasets and combined them with our orthological analysis to provide greater confidence in identifying potential biomarkers for diagnosing histoplasmosis (Figure 2). Pitifully, all proteins described as the core set of extracellular proteins produced by *H. capsulatum* (31) were found in protein clusters with similar proteins from other fungi and were initially discarded within the analysis.

At the same time, we used a transcriptome database with the phase-specific gene profiles (yeast or mycelium) of *H. capsulatum* (32) to perform a comparative analysis with our results. Interestingly, two genes encoding proteins previously defined as *H. capsulatum*-specific were identified within a subset of differentially expressed genes. One of them showed a significantly enriched expression (50-fold) in the yeast phase compared to the mycelia phase (*Hc110_Ag*), and the other was a yeast phase-specific gene (*Hc155_Ag*). The proteins encoded by those genes were considered potential candidates for biomarkers diagnosis. (Table 3).

In addition, we used a urine-peptides database from immunoassay-positive patients with disseminated histoplasmosis previously published by Crockett. (33). Considering that this report was able to identify several *Histoplasma* proteins possibly involved in both intra and extra-cellular biological processes, which are not necessarily secreted, but represent the urine-proteome associated with *Histoplasma*-antigenuria, the comparative analysis was performed with the total all-*Hc*-proteins identify by OrthoMCL plus a nr_BLASTp (NCBI database) analysis. The results showed that three urine peptides were closely matched with two *Hc*-specific proteins according to our analysis (*Hc670_Ag* and *Hc724_Ag*). Both *Hc*-proteins were considered as diagnostic biomarkers of histoplasmosis and selected for the subsequent experimental process (Table 3). Unsurprisingly, most of the peptides published in that study corresponded to proteins that shared homology with proteins from other fungi (Supplemental Table 1). Due to this, all protein clusters obtained by OrthoMCL paired with any urine-peptides of *H. capsulatum* were further analyzed. Finally, we found that one of these clusters, related to 2 urine-peptides, contained 16 homologous proteins (according to OrthoMCL) from 5 fungal genera; *Histoplasma* [7], *Paracoccidioides* [3], *Blastomyces* [2], *Emmonsia* [2], and *Cryptococcus* [2], including a protein that was previously identified as one of the most abundant extracellular proteins produced by *Histoplasma* yeast cells (31). Subsequent BLASTp analysis revealed that the percent match and query cover was < 40% between this protein, designed at *Hc212_Ag*, and the other fungal proteins of the cluster. Considering that an antigenic epitope can be defined as a short sequence of 10 to 16 amino acids (linear and/or conformational), the low sequence similarity observed between the proteins of the cluster, and the total number of amino acids of the protein (212 aa), this *Hc*-protein (*Hc212_Ag*) was considered as a potential diagnostic biomarker (Table 3).

Table 3. Description of potential diagnostic biomarkers for histoplasmosis obtained

Hc_Ags ^a	ID_NCBI	KDa ^b	OrthoMCL cluster	Analysis databases
Hc110_Ag	gb EEH06109.1	12 KDa	<i>Histoplasma in-</i> <i>paralogous</i> gb EGC48864 gb EER37578	FPKM ^c 255:0

Hc115_Ag	gb EEH03588.1	17 KDa	Singletons	FPKM ^c 232:4
Hc670_Ag	gb EDN08842.1	75 KDa	Singletons	Urine-Hc-peptides ^d LLFVGSNSAPGR TLPDDHILQEAK
Hc724_Ag	gb EDN06621.1	81 KDa	Singletons	Urine-peptide ^d KLSTLVGALATRN
Hc212_Ag	gb EDN09437	23 KDa	<p><i>Histoplasma in-</i> <i>paralogous</i></p> <p>Hc04 EDN09437.1 Hc01 EEH04145.1 Hc02 EGC48357.1 Hc01 EEH03007.1 Hc03 EER42161.1 Hc02 EGC43734.1 Hc03 EER40420.1</p> <p><i>Paracoccidioides</i> homologs</p> <p>gb XP_015700594.1 gb EEH44665.2 gb KGY15563.1</p> <p><i>Blastomyces</i> homologs gb EGE86184.2 gb OJD22518.1</p> <p><i>Emmonsia</i> homologs gb KLJ06008.1</p>	Urine-Hc-peptides ^d MFYFDSEFVGPPR LLWGAQQR

			gb KKZ65985.1 <i>Cryptococcus</i> homologs gb ADV24578.1 gb KIR57842.1	
--	--	--	---	--

- a. Name defined by authors
- b. Molecular weight based on the amino acid sequence
- c. Gene expression calculated as Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM). Value as yeast:mycelia ratio. Reference (32)
- d. *Histoplasma*-specific peptides identified by Crockett *et al* (33)

Protein expression and immunoreactivity

The construct of the expression vector for each candidate was obtained by GeneArt (Gen Synthesis services, USA). The recombinant protein was induced in *E. coli* BL21 (strain DE3) and purified by affinity column chromatography (as described in the “Materials and methods” section). Additionally, the *Hc212_Ag* purified was obtained by external protein expression services (GenScript, Biotech Corporation, USA). The expression of recombinant proteins, *Hc670_Ag* and *Hc212_Ag*, was confirmed by SDS-PAGE, and the molecular weight was found to be around 75 KDa and 40 KDa, respectively (figures 3A and 3C). *Hc110_Ag*, *Hc155_Ag*, and *Hc724_Ag* were not possible to express and purify at the time of this publication so they will be used in other future studies.

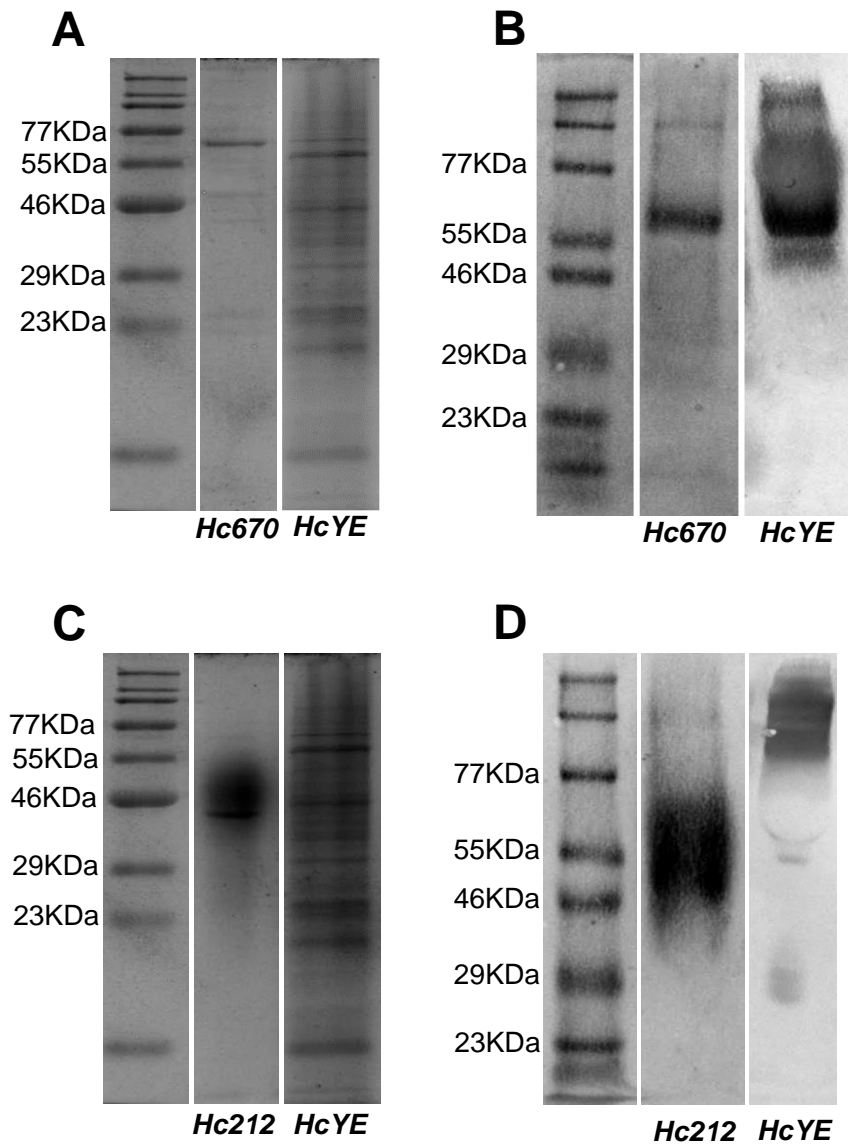


Figure 3. Protein expression and reactivity of polyclonal antibody anti-*Hc670_Ag* and anti-*Hc212_Ag*. SDS-PAGE (A, C) and western blotting (B, D) of *Hc670_Ag* (A, B) or *Hc212_Ag* (C, D) protein purified, and culture extract collected from *H. capsulatum* yeast (*Hc YE*) running at 12% with molecular weight markers. Specific reactivity of polyclonal antibody (PAb) of (A) PAb anti-*Hc670_Ag* or (B) PAb anti-*Hc212_Ag* obtained from mice immunized were evaluated.

The SDS-PAGE of purified proteins and culture extracts of *H. capsulatum* (yeast), *Candida albicans* (yeast), and *Aspergillus fumigatus* (mycelium) were immunoblotted with mice's sera and the reactivity of the polyclonal antibodies anti-*Hc670_Ag* and anti-*Hc212_Ag* was observed only with purified proteins and *H. capsulatum* yeast extracts (Figures 3B and 3D) but not with the other fungal extracts (Figures 4A and 4B). As a control, commercial monoclonal antibody anti-*C. albicans* was used against fungal extracts (Figure 4C).

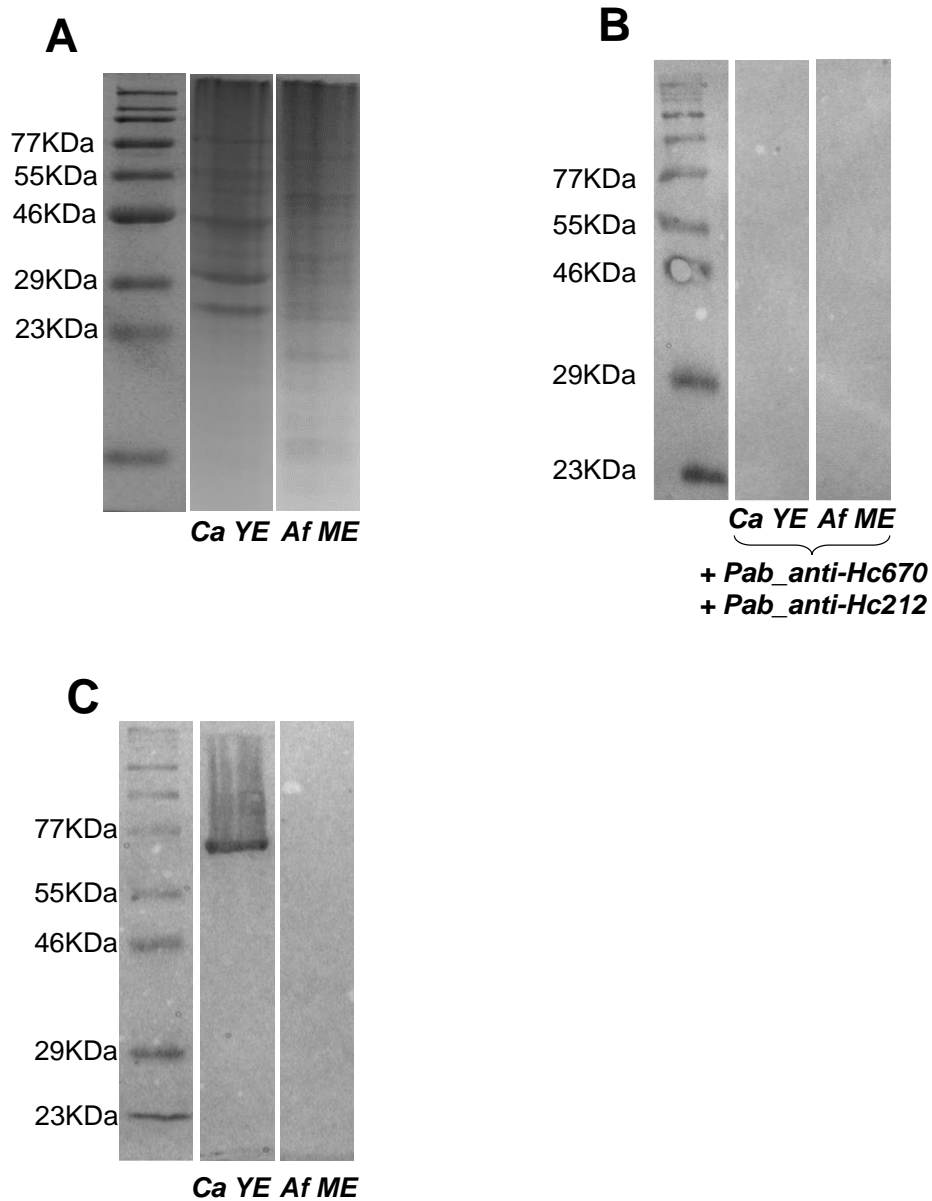


Figure 4. Immunoreactivity of polyclonal antibodies anti-*Hc670_Ag* and anti-*Hc212_Ag* to culture extracts of *C. albicans*. SDS-PAGE (A) and western blotting (B, C) of culture extracts of *C. albicans* yeast (*Ca YE*) and *A. fumigatus* mycelium (*Af ME*) running at 12% with molecular weight markers. Specific reactivity of polyclonal antibody (PAb) of anti-k, anti-*Hc212_Ag* (B) and commercial antibody anti-*C. albicans* (C) were evaluated.

Finally, preliminary experiments were performed with urine samples from patients with confirmed histoplasmosis. It was observed that both anti-*Hc670_Ag* and anti-*Hc212_Ag* were immunoreactivity with the samples (Figures 5A and 5B), indicating that both specific *H. capsulatum* proteins have potential use as diagnostic biomarkers for human histoplasmosis.

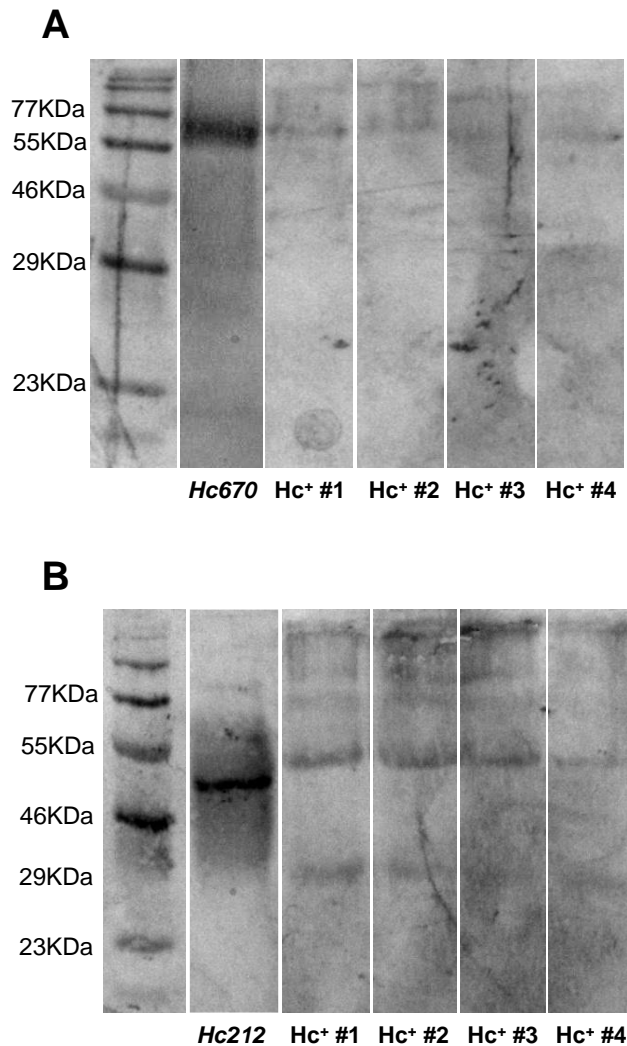


Figure 5. Immunoreactivity of PAbs anti-*Hc670_Ag* and anti-*Hc212_Ag* to samples from patients with confirmed histoplasmosis. Immunoblots of individual urine samples from patients with a confirmed diagnosis of histoplasmosis (Hc^+ #1 _ #4) demonstrated reactivity to PAb anti-*Hc670_Ag* (A) and anti-*Hc212_Ag* (B). Purified proteins were used as a control.

DISCUSSION

In fungal infections, the concept of circulating antigens in infected host serum as potential biomarkers of diseases has been reported for many years ago (34-37). Currently, immunoassay tests involving fungal antigen detection are widely used in clinical practice to diagnose and monitor antifungal treatment.

In the case of histoplasmosis, the detection of circulating antigen has been described as the best option for diagnosis, mainly in immunocompromised patients with disseminated histoplasmosis (9, 38). There are two major EIA tests based on the detection of low molecular weight *H. capsulatum* polysaccharide antigens (HPA) present in the urine and serum of patients, which have been validated in two laboratories: *Mvista*® *Histoplasma Quantitative EIA test* (Miravista Diagnostics, Indianapolis, USA) and *IMMY*® *ALPHA Histoplasma Antigen EIA test* (Immuno-Mycologics, Inv., Norman, OK) (39). The first uses polyclonal antibodies for HPA and is available only in the United States of America. In contrast, the second is a commercial EIA test that uses monoclonal antibodies and has been validated in some Latin American laboratories, mainly with urine samples. However, it is not recommended for other biological specimens due to the variable sensitivity demonstrated (10, 40, 41). Additionally, several authors have reported discrepant results with samples analyzed with these tests and cross-reactions with other fungal infections. (11, 14, 42-44). Recently, one of these companies developed a new lateral flow assay (LFA) for detecting HPA in urine samples (45, 46) that may allow a point-of-care diagnosis of histoplasmosis. However, cross-reactivity is still one of the significant challenges.

Likewise, it has been described that other antigens of *H. capsulatum*, commonly used in serodiagnosis, such as M and H antigens, exhibit cross-reactivity with other dimorphic fungi (47, 48). Considering that currently, no specific and clearly defined biomarkers of *H. capsulatum* are known, we used several analytical approaches to identify potential biomarkers for diagnosis of histoplasmosis by applying different bioinformatics tools, including computational platforms for orthology and prediction of secretory proteins and comparative analysis with multiple experimental datasets that provide a comprehensive proteomic-scale analysis.

Indeed, the recent advances in NGS (*Next Generation Sequencing*) technologies, the increasing genome and protein entries into NCBI (National Center of Biotechnology

Information), and the development of new bioinformatics algorithms have facilitated the studies on genomic and proteomic comparative. The OrthoMCL is an algorithm widely used for identifying orthologs proteins between multiple species based on the sequence similarity (*all vs all* BLASTp), which also allows to recognition of those specific proteins for each species (25, 49-51). Our study used a predicted proteome of four *H. capsulatum* strains (*G186A*, *H88*, *H143* and *Nam1*). These proteomes exhibited differences in genome length (Mbp) and the number of annotated proteins that could be related to a non-identical workflow of sequencing and assembly defined by each NCBI-Bioproject per strain (52).

By OrthoMCL analysis, the *H. capsulatum* proteomes were compared with other proteomes of clinically significant or phylogenetically related fungal pathogen, that also infect immunocompromised patients and cause nonspecific and indistinguishable symptoms (8, 15, 53). Additionally, despite the noticeable recognized difference between fungi and bacteria, the *Mycobacterium tuberculosis* proteome was included in the analysis, considering the high incidence of histoplasmosis with pulmonary tuberculosis cases reported among people living with HIV / AIDS and the similarity of the clinical and radiological presentations between both (54, 55). The results obtained showed that 1.851 of 25.770 protein groups formed by OrthoMCL contained proteins from each fungi species with high genetic similarities and were considered homologs proteins, which could be a consequence of common ancestry, horizontal transfer in a shared habitat, or a mixture of both (56, 57). Additionally, the present analysis showed that for each fungal species, a group of unique proteins, “*singletons*” that could be used in future studies also focused on identifying new diagnostics biomarkers.

Particularly, *H. capsulatum* showed a total of 3.230 singleton proteins (average of 800 singletons proteins per strain) and multiple in-paralogs protein clusters with high sequence similarities (1.567 clusters for a total of 3.572 proteins), which could be assumed as a single protein. However, considering the differences between strains mentioned above, each protein of these paralogs clusters was evaluated individually. Alternately, a BLASTp analysis using NCBI-compiled nr databases containing non-redundant RefSeq protein records from GenBank and other protein data bank archives (*PDB*, *Swiss-Prot*, *UniProt*, etc.) was considered in our analysis, which improved the precision of the study, allowing the identification of particular *H. capsulatum* proteins (58, 59).

Our strategy also included the prediction of putative secreted proteins that contained the signal sequence and were identified as targeting the classical secretory pathway. All *Hc-proteins* were analyzed with the amino-acid sequence-based predictors SignalP and TargetP. Thus, only those proteins that had the following characteristics: i) an N-terminal signal peptide (SP); ii) no transmembrane domains, and iii) no localization signal predicted to target the protein to the mitochondria or other intracellular organelles were considered by “secreted *Hc-proteins*”. We observed differences in the number of predicted secreted proteins by each program which could be due to SignalP predicting the presence of N-terminal (and cleavable) signal peptides, while TargetP includes the prediction of transmembrane segments associated with other subcellular localization (cytoplasmic space or cellular membrane) (60). Another analysis of non-classical pathways was not considered since few proteins secreted by this pathway have been described in fungi. The current bioinformatics programs focused on this approach, such as SecretomeP 2.0, are not fully ported and only work for mammalian and Gram-negative proteins (61, 62). Overall, this prediction approach would allow us to target possible circulating antigens the fungus releases during an infection.

Even though the robustness and extensive use of computational biology, it is essential to validate the scientific finding through empirically-based knowledge or experimental methods that enhance the confidence and accuracy of predictive computational models (63, 64). Accordingly, we used a previously published unique representative dataset of peptides obtained directly from urine samples of patients with disseminated histoplasmosis (33, 65). In this study, the authors reported that some peptides contained sequences homologous to conserved hypotheticals *H. capsulatum* proteins. However, the specificity of these peptide-related proteins was not fully verified. Interestingly, through this dataset, we identified 3 proteins, two of these considered by OrthoMCL as singletons proteins of *H. capsulatum* (*Hc670_Ag* and *Hc724_Ag*), that would have experimental evidence as circulating antigens of urine (and presumably in serum) of infected patients.

Both *Hc670_Ag* and *Hc724_Ag*, are classified as predicted proteins with unknown biological function, molecular or biochemical structure, or recognized orthologs or homologs (based on sequence similarity). Several reports have described that approximately 80% of *H. capsulatum* yeast phase-regulated genes encode hypothetical and uncharacterized unknown proteins, highlighting how little is currently understood about the biology of *H. capsulatum*

and the need for further studies focused on characterizing at the molecular level and gaining a comprehensive view of genes that can serve as potential biomarkers to diagnosis (31, 32, 66, 67). Coincidentally, some authors have reported the production of murine monoclonal antibodies with potential use in epidemiology and serodiagnosis that recognized an *H. capsulatum* antigen with an apparent molecular mass of 70-75 KDa, like *Hc670_Ag*, but exhibited weak reactivity to antigens derived from *Sporothrix*, *Paracoccidioides* or *Blastomyces* (68-70). However, these studies utilized a whole yeast cell extract that could contain antigens shared with other fungal pathogens, contrary to the use of individual *H. capsulatum*-specific antigens as proposed in this study.

Regarding the other identified protein, *Hc212_Ag*, it is a predicted glycosylated protein with a molecular weight based on the amino acid sequence of 23 KDa that was matched with a secreted and yeast-phase-specific protein with unknown functions previously designated *Cfp-4* (*Culture filtrate protein*) (31) and linked to an ortholog group of proteins from *H. capsulatum* and other fungi. However, some reports have described that OrthoMCL can cluster genes with high-scoring (bit-score) alignments and statistical estimates of E-value <0,001 with a percent identity of 30% that are not homologs or share functional similarity (58, 71, 72). Therefore, by analyzing all protein clusters paired with any of the *H. capsulatum* urine-peptides, we found that, particularly, a protein cluster with 7 in-paralogs proteins of *H. capsulatum* (homologs to *Cfp4*) and 9 putatively homologous proteins of other fungi (*Paracoccidioides* [3], *Blastomyces* [2], *Emmonsia* [2], and *Cryptococcus* [2]), unexpectedly had a low sequence similarity. The above, added to the fact that *Cfp4* was described as one of the main extracellular factors produced by *H. capsulatum*, although it does no apparent role in the virulence or pathogenesis of infection (31, 73), could be considered as an *H. capsulatum*-specific yeast-phase exoantigen. However, to our knowledge, there is no investigation evaluating this protein's potential utility as a diagnostic histoplasmosis biomarker.

Under this same approach, we identified two other proteins (*Hc110_Ag* and *Hc115_Ag*) predicted as putative secreted proteins of *H. capsulatum* and differentially upregulated in the yeast phase (related to active infection) that could have great potential as diagnostic biomarkers. Until now, non-identical or similar proteins have been reported previously. However, as of this publication's date, it was impossible to fine-tune the protein

synthesis and purification processes and verify their presence in yeast culture extracts. Thus, these will be analyzed in further studies.

On the other hand, other strategies focused on identifying extracellular antigens released during infection have been published with *Candida* and *Aspergillus*. These strategies were based on producing hybridoma cell lines and monoclonal antibodies (MAb) from specific structural and metabolic components, such as germ-tube-specific antigens, hyphal cell wall antigens, or galactomannan-like antigens (3, 74-76). However, lyophilized mycelium or ethanol-precipitated exoantigens from mycelial culture were used as immunogens, and cross-reactivity could be expected since many of these antigens contain epitopes and carbohydrates residues shared with other fungal pathogens, implying that many MAb must be screened to identify specific individual epitopes. In our case, specific purified proteins were administered with an adjuvant to boost the induction of effective antibody response, which minimizes the risk of cross-reactivity with another fungal pathogen. Likewise, the production of polyclonal antibodies (PAb) was chosen, considering our primary purpose, and they are cheaper, easier, and quicker to generate than MAb, which is very expensive and requires considerable time to produce (6 and 9 months) (77, 78). In addition, it has been shown that PAb has greater sensitivity and performance if cross-reactivity can be avoided, as was observed in assays with culture extracts of *C. albicans* and *A. fumigatus* (42).

Finally, both PAb (*anti-Hc212_Ag* and *anti-Hc670_Ag*) were shown to be reactive against purified antigens, *H. capsulatum* yeast culture extracts, and samples from patients with a confirmed diagnosis of histoplasmosis. Previously, it has been suggested that most yeast-phase culture filtrates are characterized by a prominent slower mobility smear consistent with the presence of highly glycosylated proteins, including some with low molecular weight, like those observed at the top of the membrane in the western immunoblot (31, 70, 79, 80). This result could be attributed to the polysaccharide nature of *Hc212_Ag* and other unknown proteins homologs to *Hc670_Ag* present in *H. capsulatum*.

Considering that the major impediment to the development of a new specific immunoassay for the diagnosis of infectious disease is the identification of appropriate antigen targets, this strategy has the potential to be used as a platform to identify new diagnostic biomarkers from a broad spectrum of microbial pathogens. The antigens

Hc670_Ag and *Hc212_Ag* specific for *H. capsulatum* are two potential antigens identified by this strategy and serve as proof of concept. However, future studies are necessary to evaluate the performance of new immunological diagnostic platforms with our anti-*Histoplasma* PAbs in terms of sensitivity and specificity with samples from patients with histoplasmosis and other fungal infections.

MATERIALS AND METHODS

Comparative analysis and ortholog prediction

To identify those proteins specific to *H. capsulatum*, a simple analysis of orthologs species was determined using the *OrthoMCL algorithm* (25) with all evaluation parameters established by default, including *P-value* cutoff: $1e^{-5}$, percent identity and percent match cutoffs: 30%, maximum weight: 100 and Markov inflation index: 1.5.

All evaluation parameters of the software were set by default. A total of 343.723 protein sequences were included in a local proteome database obtained from references strains collection of GenBank database, available at the NCBI ftp site (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/>). The collection was generated with thirty-five proteomes from twelve genera of fungi; *Histoplasma* spp., *Emmonsia* spp., *Blastomyces* spp., *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Pneumocystis* spp., *Aspergillus* spp., *Talaromyces* spp., *Fusarium* spp., *Schizophyllum* spp. and two proteomes of bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (see Table 1).

Prediction of secreted antigenic proteins

Complementary, secretory domain prediction was performed using SignalP 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (29) to determine the presence and location of signal peptide cleavage sites and the TargetP 2.0 server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>) (28) to predict other subcellular locations by N-terminal pre_sequences (mitochondrial transit peptide [mTP], chloroplast transit peptide [cTP] or thylakoid luminal transit peptide [lTP]) and not consider them as secreted proteins.

All proteins identified as *Hc-specific* by OrthoMCL were processed with both amino-acid sequence-based predictors to establish the presence of signal peptides and their subcellular locations (mitochondrial or secretory pathway) of them. Only those proteins with a score value above the threshold in both programs were considered as potentially secreted antigens.

Comparative analysis with experimental data set

Databases from the previously published experimental dataset were integrated into the study. The *Hc*-proteins obtained by orthological analysis were compared with a secreted proteome database obtained from pathogenic yeast-phase *H. capsulatum* culture filtrates (31), a *Histoplasma yeast* and mycelial transcriptomes database (32), and a urine-peptides database from *Histoplasma-immunoassay*-positive patients (33). Only the proteins matched with any homologs of these experimental databases were considered for further experiments as a candidate for diagnostic biomarker.

Expression and Purification of recombinants proteins

For each *Hc_Ag* gene (*Hc110_Ag*, *Hc115_Ag*, *Hc670_Ag*, and *Hc724_Ag*), the expression vectors were obtained by GeneArt (Gene Synthesis services, ThermoFisher Scientific, USA). The services included the full-length gene cloning into pET-100 D / TOPO expression with a polyhistidine (6xHis) tag at the N-terminal region to facilitate its purification by affinity binding to a nickel-charged agarose resin (Ni-NTA). *E. coli* BL21 (DE3) were subsequently transformed and cultured. Expression of the protein in *E. coli* was induced with 0,5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37°C for 6h. Then, cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm for 10min at 4°C and resuspended with lysis buffer (PBS; 500 mM NaCl; 4% L- Sarcosyl), followed by a freeze-thaw cycle with liquid nitrogen and incubation at 37°C for 30 min to solubilize the inclusion bodies that contain the recombinant protein. The cell extracts were centrifuged at 5000 rpm x 10 min at 4°C to perform the recombinant His-tagged protein purification. The supernatant was passed through a *HisPur*TM Ni-NTA *Spin column* (ThermoFisher Scientific, USA) to bind the His-tagged *Hc_Ag* protein. Afterward, the column was washed two times with washing buffer (PBS; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazole), and the bound protein was eluted with elution buffer (PBS; 500 mM NaCl; 100mM Imidazole, pH 6.0).

Hc212_Ag purified was obtained by GenScript (Protein expression services, GenScript Biotech Corporation, New Jersey, USA) through the mammalian CHO (Chinese Hamster Ovary) expression system.

Expression of both *Hc_Ags* was confirmed by SDS-PAGE. The concentration was determined for the Bradford protein Assay. The purified recombinant proteins were stored at -80°C.

In vivo immunization model

BALB/c mice were obtained from the breeding colony maintained at Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB (Medellín, Colombia). A rapid immunization schedule previously described was adapted to recover polyclonal antisera (81). Briefly, 8-10-week-old female BALB/c mice were immunized with purified *Hc-proteins* following one intraperitoneal (i.p.) injection at days 0 (25 µg of *Hc_Ag* per injection, mixed in solution with an equal volume of Freund's complete adjuvant, FCA) and four i.p. injections at days 7, 14, 21 and 28 (25 µg per injection) with Freund's incomplete adjuvant (FIA). Three days after the last injection, the total blood volume of immunized mice was collected (polyclonal antisera). Additionally, spleen cells from immunized mice were stored at -80°C in DMEM medium supplemented with 10% DMSO and 20% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen Corporation, CA, USA) for further studies.

This study followed the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and followed the Colombian (Law 84/1989, Resolution No. 8430/1993), European Union, and Canadian Council on Animal Care regulations. The protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the CIB.

Fungal culture

Yeast culture of *Histoplasma capsulatum* (strain G186A) and *Candida albicans* and mycelium culture of *Aspergillus fumigatus* were used for all studies. In addition to the maintenance of the yeast-phase of *H. capsulatum* and *C. albicans*, cultures were grown at 37°C in brain heart infusion (BHI, Gibco Invitrogen Corporation, CA, USA) supplemented with 100 U/ml Penicillin – 100 µg/ml Streptomycin (Gibco Invitrogen Corporation, CA, USA) and Saboraud dextrose broth (SDB, BD DIFCO™, Becton, Dickinson and Company, USA), respectively. *A. fumigatus* mycelium culture was maintained at 25°C in SDB medium.

The fungal suspension was pellet by centrifugation (1500 rpm, 10°C for 10 min), washed two times with PBS (Gibco, Invitrogen Corporation, CA, USA), and lysed using

liquid nitrogen. Then, the frozen samples were resuspended in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% NP-40, and 1X protease inhibitor cocktail (Roche)] and sonicated for 10 min. Finally, cell debris was pelleted by centrifugation at 5000 rpm for 5 min, resuspended in minimum volume with lysis buffer, and stored at -20°C for subsequent analysis.

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

Purified protein (*Hc_Ags*), culture extracts of *H. capsulatum*, *C. albicans*, and *A. fumigatus* and urine samples from patients with confirmed histoplasmosis were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Briefly, each sample was mixed with 2X loading buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 20% glycerol, 200 mM β -mercaptoethanol) and boiled for 5min. The samples were electrophoresed on a 12% SDS-polyacrylamide gel for 90min at 100V at room temperature on a Mini-PROTEAN Electrophoresis system (Bio-Rad, San Diego, USA). For visualization of separated proteins, gels were stained with Coomassie blue staining buffer for 1 h, followed by washing with discoloration buffer (10% acetic acid, 5% methanol). Coomassie-stained gels were analyzed with visualized by Trans illuminator (Molecular Imager® Gel DocTMXR, BIORAD).

Immunoblotting analysis

Immunoblot analysis was performed to evaluate the seroreactivity of serum from mice previously immunized. Briefly, the proteins resolved in SDS-PAGE were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane at 80 V for 90 min using the Trans-Blot® Blotting system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membrane was washed twice with Tris-buffered saline (TBS) supplemented with 0.1% tween-20, 1% methanol, blocked for 1 h with 1% skim milk in TBS, and followed by washing three times for 5 min. The membrane was probed with polyclonal serum diluted to 1:1.000 (pooled serum from immunized animals) for 2 hours at room temperature by gentle shaking to perform immunoblotting. Then, the membrane was washed three times and incubated with secondary antibody horseradish-peroxidase-labeled goat anti-IgG mouse antibody (Abcam, Cambridge, UK), dilution 1:10.000 for 1 hour at room temperature. Next, the membrane was washed and subjected to chemiluminescence using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) according to the manufacturer's

specifications. Band intensity was analyzed by ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by MINCIENCIAS, Colombia, grant *MinCiencias National Doctorate Program Funding*, and by the Sustainability grant from the Research Committee (CODI) of Universidad de Antioquia.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the study design, analysis and interpretation of experiments, decision to publish, or manuscript preparation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.D.P.A. and T.N.P. elaborated and designed the study. J.D.P.A., J.P.I.A., and T.N.P. performed analysis and interpretation of the data. All authors contributed to the writing and the final approval of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

OrthoMCL output data is available in *Additional file 1 Groups_OrthoMCL clusters* (*.TXT).

Urine-peptides database from *Histoplasma-immunoassay-positive* patients published by Crockett *et al* 2012 (33) plus orthoMCL comparative analysis is available in *additional file 2. Histoplasma urine-peptides plus OrthoMCL cluster* (*.XLXS).

REFERENCE

1. Gao Y, Huang X, Zhu Y, Lv Z. 2018. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *J Immunoassay Immunochem* 39:351-364.
2. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. 2012. beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis* 54:633-43.
3. Nogueira F, Istel F, Pereira L, Tscherner M, Kuchler K. 2017. Immunological Identification of Fungal Species. *Methods Mol Biol* 1508:339-359.
4. Bahr NC, Antinori S, Wheat LJ, Sarosi GA. 2015. Histoplasmosis infections worldwide: thinking outside of the Ohio River valley. *Curr Trop Med Rep* 2:70-80.
5. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. 2011. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* 49:785-98.
6. Cáceres DH, Zuluaga A, Arango-Bustamante K, de Bedout C, Tobón AM, Restrepo A, Gómez BL, Cano LE, Gonzalez A. 2015. Implementation of a Training Course Increased the Diagnosis of Histoplasmosis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 93:662-7.
7. Hage CA, Azar MM, Bahr N, Loyd J, Wheat LJ. 2015. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. *Semin Respir Crit Care Med* 36:729-45.
8. Kauffman CA. 2008. Diagnosis of histoplasmosis in immunosuppressed patients. *Curr Opin Infect Dis* 21:421-5.
9. Cáceres DH, Knuth M, Derado G, Lindsley MD. 2019. Diagnosis of Progressive Disseminated Histoplasmosis in Advanced HIV: A Meta-Analysis of Assay Analytical Performance. *J Fungi (Basel)* 5.
10. Fandino-Devia E, Rodriguez-Echeverri C, Cardona-Arias J, Gonzalez A. 2016. Antigen Detection in the Diagnosis of Histoplasmosis: A Meta-analysis of Diagnostic Performance. *Mycopathologia* 181:197-205.

11. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. 2007. Evaluation of the IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol* 14:802-3.
12. Cáceres DH, Scheel CM, Tobón AM, Ahlquist Cleveland A, Restrepo A, Brandt ME, Chiller T, Gómez BL. 2014. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay that detects *Histoplasma capsulatum* antigenuria in Colombian patients with AIDS for diagnosis and follow-up during therapy. *Clin Vaccine Immunol* 21:1364-8.
13. Zhang X, Gibson B, Jr., Daly TM. 2013. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 51:4095-101.
14. Theel ES, Harring JA, Dababneh AS, Rollins LO, Bestrom JE, Jespersen DJ. 2015. Reevaluation of commercial reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in urine. *J Clin Microbiol* 53:1198-203.
15. Torres-Gonzalez P, Niembro-Ortega MD, Martinez-Gamboa A, Ahumada-Topete VH, Andrade-Villanueva J, Araujo-Melendez J, Chaparro-Sanchez A, Crabtree-Ramirez B, Cruz-Martinez S, Gamboa-Dominguez A, Flores-Barrientos OI, Gaytan-Martinez JE, Gonzalez-Hernandez LA, Hernandez-Leon C, Lozano-Fernandez VH, Manriquez-Reyes M, Magana-Aquino M, Martinez-Ayala P, Ramirez-Hinojosa JP, Rangel-Cordero A, Rivera-Martinez NE, Reyes-Gutierrez E, Reyes-Teran G, Rodriguez-Zulueta P, Ruiz-Quinones J, Santiago-Cruz J, Velazquez-Zavala NG, Sifuentes-Osornio J, Ponce de Leon A. 2018. Diagnostic accuracy cohort study and clinical value of the *Histoplasma* urine antigen (ALPHA *Histoplasma* EIA) for disseminated histoplasmosis among HIV infected patients: A multicenter study. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006872.
16. Connolly PA, Durkin MM, Lemonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. 2007. Detection of *Histoplasma* antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 14:1587-91.
17. Assi M, Lakkis IE, Wheat LJ. 2011. Cross-reactivity in the *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay caused by sporotrichosis. *Clin Vaccine Immunol* 18:1781-2.
18. Kuberski T, Myers R, Wheat LJ, Durkin M, Connolly P, Kubak BM, Bruckner D, Pegues D. 2007. Diagnosis of coccidioidomycosis by antigen detection using cross-reaction with a *Histoplasma* antigen. *Clin Infect Dis* 44:e50-4.

19. Maphanga TG, Naicker SD, Gómez BL, Mhlanga M, Mpembe RS, Schwartz IS, Bamford C, Nel J, Govender NP. 2021. Cross-reactivity of a *Histoplasma capsulatum* antigen enzyme immunoassay in urine specimens from persons with emergomycosis in South Africa. *Med Mycol* 59:672-682.
20. Vergidis P, Walker RC, Kaul DR, Kauffman CA, Freifeld AG, Slagle DC, Kressel AB, Wheat LJ. 2012. False-positive *Aspergillus* galactomannan assay in solid organ transplant recipients with histoplasmosis. *Transpl Infect Dis* 14:213-7.
21. Wheat J, Wheat H, Connolly P, Kleiman M, Supparatpinyo K, Nelson K, Bradsher R, Restrepo A. 1997. Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis* 24:1169-71.
22. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ, Knox K, Hage C. 2007. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 14:638-40.
23. Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. *Biochem Pharmacol* 133:86-96.
24. Nett JE, Andes DR. 2016. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am* 30:51-83.
25. Li L, Stoeckert CJ, Jr., Roos DS. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 13:2178-89.
26. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.
27. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36:W5-9.
28. Almagro Armenteros JJ, Salvatore M, Emanuelsson O, Winther O, von Heijne G, Elofsson A, Nielsen H. 2019. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance* 2.
29. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785-6.
30. Subramanian I, Verma S, Kumar S, Jere A, Anamika K. 2020. Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinform Biol Insights* 14:1177932219899051.

31. Holbrook ED, Edwards JA, Youseff BH, Rappleye CA. 2011. Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. *J Proteome Res* 10:1929-43.
32. Edwards JA, Chen C, Kemski MM, Hu J, Mitchell TK, Rappleye CA. 2013. *Histoplasma* yeast and mycelial transcriptomes reveal pathogenic-phase and lineage-specific gene expression profiles. *BMC Genomics* 14:695.
33. Crockett DK, Kushnir MM, Cloud JL, Ashwood ER, Rockwood AL. 2012. Identification of *Histoplasma*-specific peptides in human urine. *Int J Pept* 2012:621329.
34. Warren RC, Bartlett A, Bidwell DE, Richardson MD, Voller A, White LO. 1977. Diagnosis of invasive candidosis by enzyme immunoassay of serum antigen. *Br Med J* 1:1183-5.
35. Richardson MD, White LO, Warren RC. 1979. Detection of circulating antigen of *Aspergillus fumigatus* in sera of mice and rabbits by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycopathologia* 67:83-8.
36. Sabetta JR, Minitier P, Andriole VT. 1985. The diagnosis of invasive aspergillosis by an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating antigen. *J Infect Dis* 152:946-53.
37. Richardson MD, Warnock DW. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay and its application to the serological diagnosis of fungal infection. *Sabouraudia* 21:1-14.
38. Pérez F, Cáceres DH, Ford N, Ravasi G, Gómez BL, Pasqualotto AC, Hine P, Adenis AA, Nacher M, Chiller T, Baddley J, For The Guideline Development Group For D, Managing Disseminated Histoplasmosis Among People Living With H. 2021. Summary of Guidelines for Managing Histoplasmosis among People Living with HIV. *J Fungi (Basel)* 7.
39. Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. 1986. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *N Engl J Med* 314:83-8.
40. Zhang C, Lei GS, Lee CH, Hage CA. 2015. Evaluation of two new enzyme immunoassay reagents for diagnosis of histoplasmosis in a cohort of clinically characterized patients. *Med Mycol* 53:868-73.
41. Persaud SP, Lawton T, Burnham CD, Anderson NW. 2019. Comparison of Urine Antigen Assays for the Diagnosis of *Histoplasma capsulatum* Infection. *J Appl Lab Med* 4:370-382.

42. Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER. 2007. Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the quantitation of *Histoplasma* antigen in human urine samples. *Am J Clin Pathol* 128:18-22.
43. Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso IC, Severo LC. 2009. Cross-reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus* species in the commercial Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 16:132-3.
44. Ghorra N, Goushchi A, Konopnicki D, Libois A, Lagrou K, Wind A, Montesinos I, Hallin M, Deyi VYM. 2022. Disseminated histoplasmosis diagnosed by cross-reactivity with the *Aspergillus* galactomannan antigen in an HIV-positive patient. *J Mycol Med* 32:101244.
45. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón AM, Minderman M, Bridges N, Chiller T, Lindsley MD. 2021. Validation and Concordance Analysis of a New Lateral Flow Assay for Detection of *Histoplasma* Antigen in Urine. *J Fungi (Basel)* 7.
46. Cáceres DH, Gómez BL, Tobón AM, Chiller TM, Lindsley MD. 2020. Evaluation of a *Histoplasma* antigen lateral flow assay for the rapid diagnosis of progressive disseminated histoplasmosis in Colombian patients with AIDS. *Mycoses* 63:139-144.
47. Hamilton AJ, Bartholomew MA, Figueroa J, Fenelon LE, Hay RJ. 1990. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. *J Med Vet Mycol* 28:479-85.
48. Muñoz CO, Cano LE, González A. 2010. Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio* 14:s145-s158.
49. Heinicke S, Livstone MS, Lu C, Oughtred R, Kang F, Angiuoli SV, White O, Botstein D, Dolinski K. 2007. The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One* 2:e766.
50. Koonin EV. 2005. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu Rev Genet* 39:309-38.
51. Sonnhammer EL, Koonin EV. 2002. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes. *Trends Genet* 18:619-20.
52. Anonymous. 2020. Fungal Genome Initiative. Broad Institute.
53. Cáceres DH, Samayoa BE, Medina NG, Tobón AM, Guzman BJ, Mercado D, Restrepo A, Chiller T, Arathoon EE, Gómez BL. 2018. Multicenter Validation of

Commercial Antigenuria Reagents To Diagnose Progressive Disseminated Histoplasmosis in People Living with HIV/AIDS in Two Latin American Countries. *J Clin Microbiol* 56.

54. Adenis AA, Valdes A, Cropet C, McCotter OZ, Derado G, Couppie P, Chiller T, Nacher M. 2018. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 18:1150-1159.

55. Kuate MPN, Ekeng BE, Kwizera R, Mandengue C, Bongomin F. 2021. Histoplasmosis overlapping with HIV and tuberculosis in sub-Saharan Africa: challenges and research priorities. *Ther Adv Infect Dis* 8:20499361211008675.

56. Chen F, Mackey AJ, Vermunt JK, Roos DS. 2007. Assessing performance of orthology detection strategies applied to eukaryotic genomes. *PLoS One* 2:e383.

57. Gabaldon T, Koonin EV. 2013. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nat Rev Genet* 14:360-6.

58. Pearson WR. 2013. An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 3:Unit3 1.

59. Pearson WR, Sierk ML. 2005. The limits of protein sequence comparison? *Curr Opin Struct Biol* 15:254-60.

60. Imai K, Nakai K. 2020. Tools for the Recognition of Sorting Signals and the Prediction of Subcellular Localization of Proteins From Their Amino Acid Sequences. *Front Genet* 11:607812.

61. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17:349-56.

62. Miura N, Ueda M. 2018. Evaluation of Unconventional Protein Secretion by *Saccharomyces cerevisiae* and other Fungi. *Cells* 7.

63. Jafari M, Guan Y, Wedge DC, Ansari-Pour N. 2021. Re-evaluating experimental validation in the Big Data Era: a conceptual argument. *Genome Biol* 22:71.

64. Manzoni C, Kia DA, Vandrovцова J, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, Ferrari R. 2018. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief Bioinform* 19:286-302.

65. Kushnir MM, Crockett DK, Cloud JL, Ashwood ER, Rockwood AL. 2012. Exploratory study of proteins in urine of patients with *Histoplasma* antigenuria. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 883-884:147-54.

66. Voorhies M, Foo CK, Sil A. 2011. Experimental annotation of the human pathogen *Histoplasma capsulatum* transcribed regions using high-resolution tiling arrays. BMC Microbiol 11:216.
67. Inglis DO, Voorhies M, Hocking Murray DR, Sil A. 2013. Comparative transcriptomics of infectious spores from the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* reveals a core set of transcripts that specify infectious and pathogenic states. Eukaryot Cell 12:828-52.
68. Kamel SM, Wheat LJ, Garten ML, Bartlett MS, Tansey MR, Tewari RP. 1989. Production and characterization of murine monoclonal antibodies to *Histoplasma capsulatum* yeast cell antigens. Infect Immun 57:896-901.
69. Hamilton AJ, Bartholomew MA, Fenelon LE, Figueroa J, Hay RJ. 1990. A murine monoclonal antibody exhibiting high species specificity for *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. J Gen Microbiol 136:331-5.
70. Hamilton AJ, Bartholomew MA, Fenelon L, Figueroa J, Hay RJ. 1990. Preparation of monoclonal antibodies that differentiate between *Histoplasma capsulatum* variant *capsulatum* and *H. capsulatum* variant *duboisii*. Trans R Soc Trop Med Hyg 84:425-8.
71. Ladunga I. 2017. Finding Homologs in Amino Acid Sequences Using Network BLAST Searches. Curr Protoc Bioinformatics 59:3 4 1-3 4 24.
72. Hu G, Kurgan L. 2019. Sequence Similarity Searching. Curr Protoc Protein Sci 95:e71.
73. Holbrook ED, Kemski MM, Richer SM, Wheat LJ, Rappleye CA. 2014. Glycosylation and immunoreactivity of the *Histoplasma capsulatum* *Cfp4* yeast-phase exoantigen. Infect Immun 82:4414-25.
74. Dufresne SF, Datta K, Li X, Dadachova E, Staab JF, Patterson TF, Feldmesser M, Marr KA. 2012. Detection of urinary excreted fungal galactomannan-like antigens for diagnosis of invasive aspergillosis. PLoS One 7:e42736.
75. Thornton CR. 2008. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. Clin Vaccine Immunol 15:1095-105.
76. Haydour Q, Hage CA, Carmona EM, Epelbaum O, Evans SE, Gabe LM, Knox KS, Kolls JK, Wengenack NL, Prokop LJ, Limper AH, Murad MH. 2019. Diagnosis of Fungal

Infections. A Systematic Review and Meta-Analysis Supporting American Thoracic Society Practice Guideline. *Ann Am Thorac Soc* 16:1179-1188.

77. Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. 2016. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Adv Exp Med Biol* 917:11-22.

78. Holzlohner P, Hanack K. 2017. Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *J Vis Exp* doi:10.3791/54832.

79. Kung LA, Tao SC, Qian J, Smith MG, Snyder M, Zhu H. 2009. Global analysis of the glycoproteome in *Saccharomyces cerevisiae* reveals new roles for protein glycosylation in eukaryotes. *Mol Syst Biol* 5:308.

80. Pruksaphon K, Ching MMN, Nosanchuk JD, Kaltsas A, Ratanabanangkoon K, Roytrakul S, Martinez LR, Youngchim S. 2020. Characterization of a novel yeast phase-specific antigen expressed during in vitro thermal phase transition of *Talaromyces marneffei*. *Scientific Reports* 10:21169.

81. Hu YX, Guo JY, Shen L, Chen Y, Zhang ZC, Zhang YL. 2002. Get effective polyclonal antisera in one month. *Cell Res* 12:157-60.

CAPÍTULO III.

Este capítulo describe la metodología y los resultados relacionados con el objetivo específico:

3.2.4 Demostrar la interacción de los anticuerpos policlonales desarrollados frente a los antígenos de *H. capsulatum* mediante un prototipo beta de prueba rápida tipo POC

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las enfermedades infecciosas son consideradas como un serio problema para el sistema de salud. Para el año 2019 se reportaron cerca 7,86 millones de muertes en el mundo por causa de algún agente patógeno [1]. En Colombia, para el año 2020 se reportó que cerca del 33% del total de muertes estuvieron asociadas con algún tipo de proceso infeccioso, viéndose afectada en mayor parte la población rural o con acceso limitado a los servicios básicos de atención [2]. Esto en gran parte debido a las dificultades que aún presentan los métodos de diagnóstico para identificar rápida y oportunamente al agente causal de la infección y la imposibilidad de implementarlos adecuadamente en ámbitos de atención primario.

Entre las muchas enfermedades de origen infeccioso y de gran importancia existentes, se encuentra la histoplasmosis, micosis ocasionada por el hongo patógeno *Histoplasma capsulatum*, considerado por la OMS (Organización Mundial de Salud) como uno de los patógenos fúngicos más peligrosos para la salud pública y que afecta principalmente a pacientes con cáncer, VIH/SIDA o que se encuentren en tratamiento con biológicos inmunosupresores [3, 4]. Actualmente, el diagnóstico de esta micosis puede realizarse con una variedad de métodos de laboratorio, incluyendo: microscopia, cultivo microbiológico, pruebas inmunológicas y pruebas moleculares. Sin embargo, para la mayoría de estas pruebas se ha reportado sensibilidad y especificidad variables, la presencia de falsos positivos por reacción cruzada con otras afecciones micóticas de igual importancia clínica y otras limitaciones asociadas con el tiempo de obtención del resultado y los altos requerimientos de personal, infraestructura y equipo especializado.

Este panorama ha evidenciado la necesidad que existe de desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico, más versátiles, y de mayor rendimiento y capacidad para detectar específicamente el agente fúngico. Las pruebas rápidas POC (del inglés, *Point-of-Care*), se consideran hoy en día como un método de diagnóstico alternativo para muchas enfermedades infecciosas, debido a su portabilidad, bajo costo, fácil y rápida interpretación [5-7].

En nuestro grupo de investigación previamente se implementó un modelo de análisis computacional enfocado en la búsqueda e identificación de nuevos antígenos con potencial como biomarcadores de diagnóstico de infección. Aplicando este modelo se logró identificar nuevos antígenos específicos para el hongo *H. capsulatum*, dos de ellos (*Ag212_Hc* y *Ag670_Hc*) ya detectados en muestras de pacientes con histoplasmosis diseminada mediante Western blot con anticuerpos policlonales específicos anti-*H. capsulatum*. Los resultados obtenidos con ambos antígenos permiten considerarlos como posibles biomarcadores de infección, y con el potencial para aplicarlos en múltiples plataformas de diagnóstico inmunológico (reacción antígeno-anticuerpo), incluyendo las pruebas rápidas tipo POC.

Actualmente, entre los diferentes tipos de pruebas de diagnóstico rápido, resaltan los biosensores inmunocromatográficos y los electroquímicos, debido al rendimiento que ambos presentan, su fácil aplicación, y versatilidad para implementarlos fuera del laboratorio o en ambientes no especializados. Los biosensores electroquímicos han venido generando gran interés, dado que combinan la alta sensibilidad de las técnicas electroquímicas con la especificidad del bioreceptor, incluyendo además la posibilidad de realizar medidas directas sobre matrices complejas de forma rápida.

Con lo anterior, y teniendo en cuenta el alto grado de sensibilidad que ofrecen los biosensores electroquímicos y el potencial que tienen para aplicarlos en múltiples ambientes, nos propusimos evaluar la interacción de los anticuerpos policlonales desarrollados contra potenciales biomarcadores específicos del hongo *H. capsulatum*, mediante un prototipo beta de inmunosensor electroquímico.

Dicho prototipo consistió en electrodos de carbono modificados por electrodeposición con nanopartículas de oro (*NPs-Au*) y funcionalizados con anticuerpos policlonales anti-*H. capsulatum*, con capacidad para reconocer antígenos específicos del hongo *H. capsulatum*.

METODOLOGÍA

Equipo de medición y caracterización electroquímica

Para los ensayos electroquímicos mediante voltamperometría cíclica (CV, del inglés *Cyclic Voltammetry*) y mediciones de Espectroscopía de Impedancia electroquímica (EIS, del inglés *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) se utilizó el potenciostato/galvanostato PalmSens 3, con el software PSTrace versión 5.9 (PalmSens BV, Países bajos). Adicionalmente se analizaron los datos obtenidos por EIS utilizando el software *EIS Spectrum Analyser* (ABC Chemistry).

Activación electroquímica de los electrodos

Para el desarrollo del inmunosensor electroquímico se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono (*SPE-C*, del inglés, *screen-printing electrodes*) Italsens IS-C (PalmSens BV, Países Bajos) donados por la empresa CECOLTEC SERVICES (Medellín, Colombia). Cada *SPE-C* tenía incorporada una configuración estándar con un electrodo de trabajo (3 mm diámetro, 7,07 mm² área geométrica), un electrodo de referencia de plata y un contraelectrodo de carbono.

Para el proceso de activación de los *SPE-C*, se utilizó el protocolo recomendado por González-Sánchez y colaboradores [8], que consiste en un tratamiento electroquímico por CV a una velocidad de barrido de 0,1 V s⁻¹ en un rango de potencial de 0 V a 1,5 V (con respecto al electrodo de referencia) en una solución 100 mM H₂SO₄ (Sigma Aldrich, USA) durante 10 ciclos. Después del proceso de activación, los electrodos se lavaron con agua tipo III.

Modificación y Caracterización óptica de la superficie de los electrodos

Una vez activada la superficie de los *SPE-C*, se electrodepositaron las *NPs-Au* aplicando un potencial constante de -0,1 V por 600 segundos con una solución de 25 mM H₂SO₄ y 5 mM HAuCl₄ (Sigma-Aldrich, USA). Una vez finalizada la electrodeposición, los electrodos modificados con oro (*SPE-Au*) se lavaron con agua tipo III.

Posteriormente, para cada electrodo sin modificar (*SPE-C*) o modificado (*SPE-Au*), se estudió la superficie utilizando el Microscopio Electrónico de barrido EM-30AXN

(COXEM, Daejeon, Corea del Sur), y se caracterizó la composición química elemental por espectroscopia de rayos X por dispersión de energía (EDXS, del inglés *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) integrado al equipo.

Caracterización electroquímica de los electrodos modificados SPE-Au

Durante cada proceso de modificación de los electrodos, se evaluó el rendimiento electroquímico por CV y EIS utilizando una solución redox con 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ en 0,1 M KNO_3 (Merck Millipore, USA). Inicialmente, se calculó el área electroquímicamente activa (A_{ea}) utilizando la ecuación de Randles-Sevcik por CV. El rango de potencial fue entre -0,3 V a +0,35 V con una velocidad de barrido de $0,05 \text{ V s}^{-1}$ durante 5 ciclos. Posteriormente, el sistema se estudió por EIS, aplicando un potencial formal redox de +0,12 V, con una amplitud de onda de 10 mV y un rango de frecuencia de 100 kHz a 0,1 Hz. Para el análisis, los datos obtenidos se ajustaron a un circuito equivalente.

A continuación, se describe la ecuación de Randles-Sevcik [9] para calcular el área electroquímicamente activa (A_{ea}):

$$i_p = 0.4463nFA_eC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{1/2}$$

Donde; i_p es la intensidad de corriente de pico, n es el número de electrones involucrados en la reacción electroquímica ($n=1$), F es la constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), A_e es el área electroactiva (cm^2), C es la concentración de la especie electroactiva (mol cm^{-3}), v es la velocidad de barrido (V s^{-1}), D es el coeficiente de difusión ($7,62 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) para el $K_3[Fe(CN)_6]$ [10, 11], R es la constante universal de los gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y la T es temperatura absoluta (298,15 K).

Funcionalización de electrodos modificados SPE-Au con anticuerpos anti-Histoplasma

Cada fase relacionada con el desarrollo de los inmunosensores se caracterizó electroquímicamente bajo las mismas condiciones mencionadas en la sección anterior.

Se utilizaron, por separado, anticuerpos policlonales específicos contra proteínas únicas del hongo *H. capsulatum* previamente generados en el laboratorio (en proceso de publicación); anti-*Ag212-Hc* y anti-*Ag670-Hc*. Cada tipo de anticuerpo se inmovilizó sobre la superficie de los electrodos modificados *SPE-Au* por absorción física, adicionando 10 μl de una solución con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del anticuerpo sobre el electrodo de trabajo, e incubando por 2 horas a 4°C. La concentración utilizada del anticuerpo y las condiciones de incubación se definieron inicialmente según estudios previamente reportados en la literatura [12-14]. Una vez finalizado el tiempo de incubación, los electrodos se lavaron con agua tipo III.

Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión no específicos por incubación con solución 1% albumina de suero bovina (*BSA*, del inglés *Bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich, USA) por 10 minutos a 4°C. Finalmente cada inmunosensor se lavó con agua tipo III.

Para reducir la evaporación de las soluciones adicionadas sobre la superficie del electrodo, todas las incubaciones se realizaron en una cámara humidificada cerrada.

Detección de antígenos de *Histoplasma capsulatum*: *Ag212-Hc* y *Ag670-Hc*

Se evaluó la capacidad de cada inmunosensor desarrollado para detectar los antígenos *Ag212-Hc* y *Ag670-Hc* del hongo *H. capsulatum* diluidos a 1 μM (10^{-6} mol L⁻¹) en PBS 10 mM pH 7,4 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA). Para cada antígeno, se realizaron 3 ensayos independientes por duplicado, adicionando 10 μl de solución de antígeno en la superficie del electrodo de trabajo e incubando por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C).

La resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) de los inmunosensores se determinó por EIS en una solución 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en 0,1 M KNO_3 (Merck Millipore, USA), en condiciones de circuito abierto; rango de frecuencia de 100 kHz a 0,1 Hz, amplitud de onda de 10 mV y potencial formal +0,12 V. El cambio en los valores de R_{ct} se estimó basado en la fórmula:

$$R_{ct} = R_{ct(SPE-Au-Ac-BSA-Ag)} - R_{ct(SPE-Au-Ac-BSA)}$$

Donde $R_{ct(SPE-Au-Ac-BSA-Ag)}$ y $R_{ct(SPE-Au-Ac-BSA)}$ son los valores después y antes de la interacción del inmunosensor con el antígeno.

RESULTADOS

Desarrollo y caracterización del inmunosensor

El desarrollo del inmunosensor implicó 3 procesos principales: i) Activación con H_2SO_4 y modificación con nanopartículas de oro ($NPs-Au$) de la superficie de los electrodos, ii) Funcionalización por absorción con anticuerpos anti-*H. capsulatum* y bloqueo de sitios inespecíficos con BSA y iii) Reconocimiento de los antígenos de *H. capsulatum* por el inmunosensor electroquímico (Figura 1).

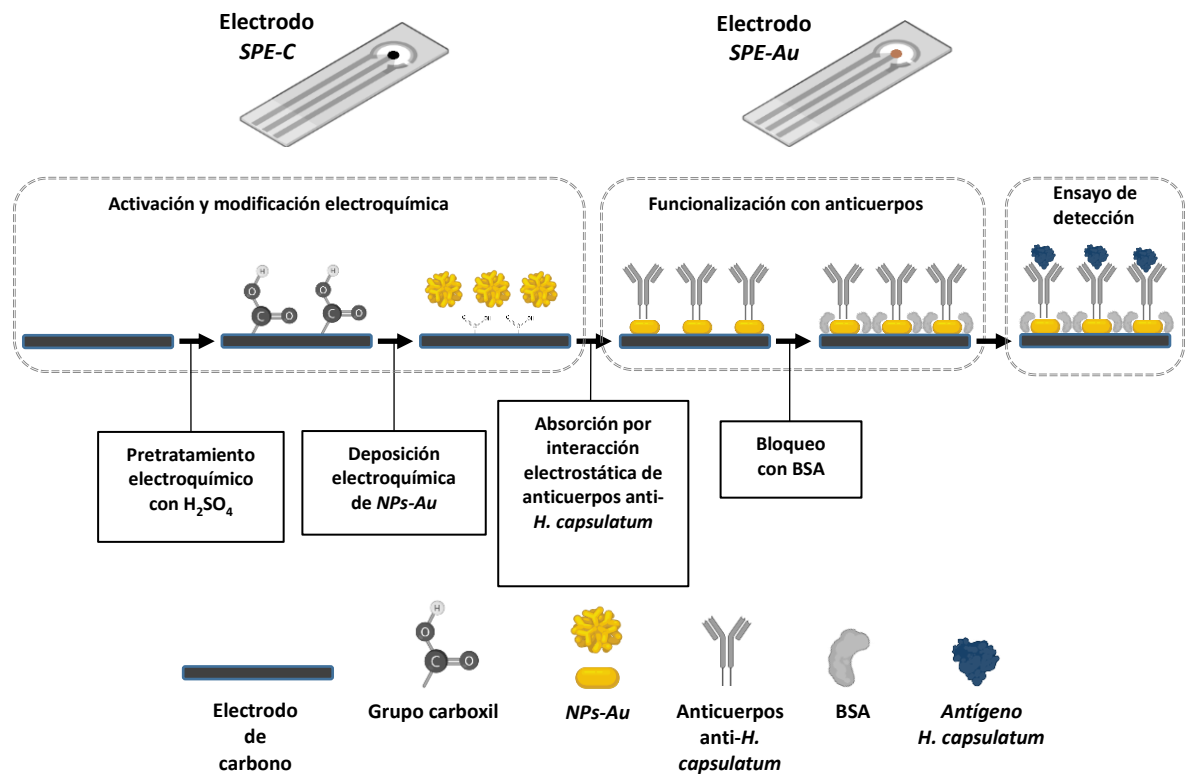


Figura 1. Esquema de desarrollo paso a paso del inmunosensor. Electrodo de carbono $SPE-C$, electrodo modificado $SPE-Au$. El proceso incluye: i) Activación electroquímica con H_2SO_4 y electrodeposición de nanopartículas de oro ($NPs-Au$) sobre electrodos $SPE-C$. ii) Funcionalización de electrodos modificados $SPE-Au$ con anticuerpos específicos anti-*H. capsulatum* y iii) Bioreconocimiento de antígenos de *H. capsulatum* por el inmunosensor desarrollado.

Activación y modificación de los electrodos SPE-C

Inicialmente, se activó electroquímicamente la superficie de los electrodos *SPE-C* y se modificó con *NPs-Au*. Dicha activación se realizó con solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con el propósito de generar grupos funcionales tipo carboxilato ($-COO^-$) que tiene gran afinidad por las *NPs-Au* por atracción electrostática, y facilitan su posterior absorción sobre la superficie de los electrodos durante el proceso de electrodeposición [8].

La electrodeposición de las *NPs-Au* se confirmó inicialmente al observarse el cambio de color de la superficie del electrodo de trabajo, pasando de un color negro (electrodo de carbono) (Figura 2A) a un color rojizo en los electrodos modificados con oro (Figura 2E). Adicionalmente, se estudió la topografía y la composición química elemental de la superficie de los electrodos modificados por microscopia electrónica de barrido y EDXS. En las figuras 2F y 2G se observa la presencia de estructuras con tamaño regular y morfología compatible con las *NPs-Au* en los electrodos modificados *SPE-Au*. El análisis de la composición y distribución elemental confirmó la presencia del elemento oro (Au) sobre un 50% de la superficie de los electrodos modificados (Figura 2H) en comparación con los electrodos sin modificar *SPE-C* (Figuras 2B, 2C y 2D).

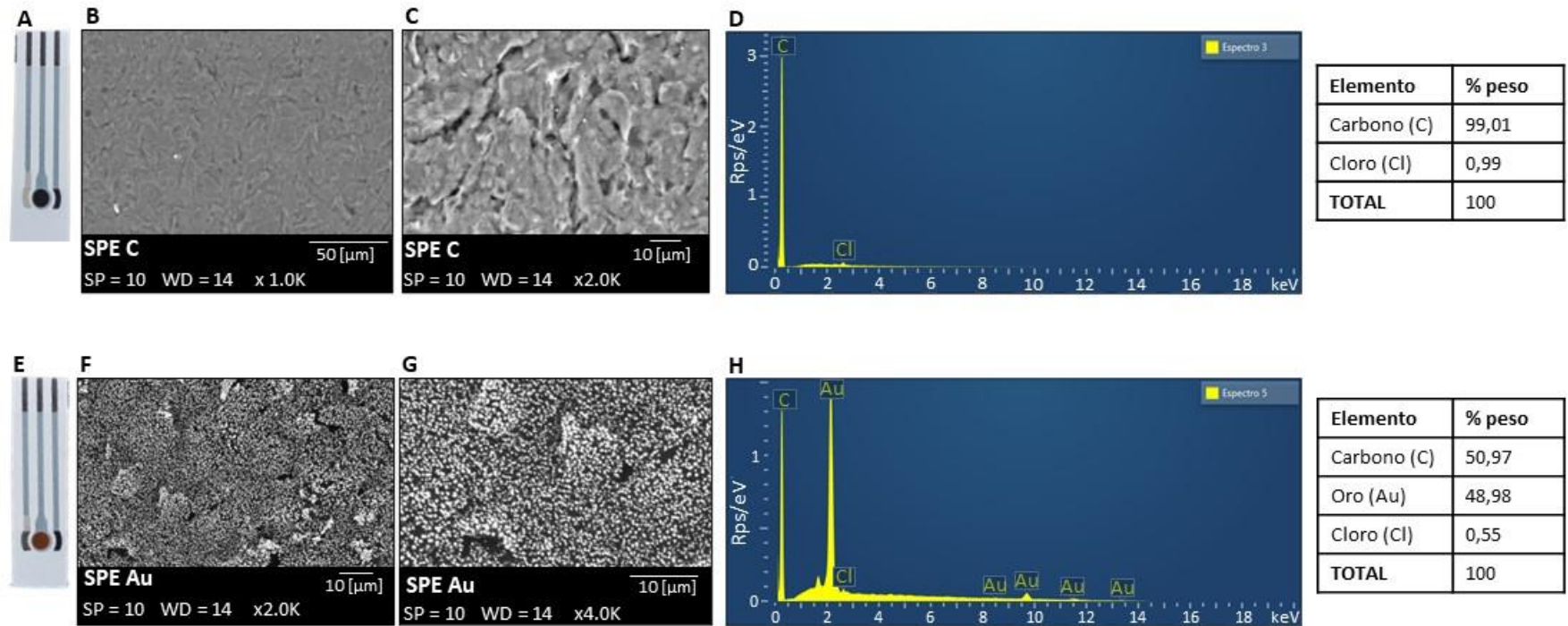


Figura 2. Caracterización óptica y análisis de la composición química elemental de los electrodos modificados. Imágenes macroscópicas (A, E) y por microscopia electrónica de barrido de electrones, de los electrodos de carbono *SPE-C* (B, C), modificados en laboratorio con nanopartículas de oro *SPE-Au* (F, G). Evaluación de la composición (espectro) y distribución elemental (mapeo elemental) mediante análisis de energía dispersiva por rayos X (EDS) de electrodos *SPE-C* (D) y *SPE-Au* (H).

Caracterización electroquímica de los electrodos modificados SPE-Au

Adicionalmente, los electrodos modificados *SPE-Au* se caracterizaron electroquímicamente por CV y EIS. La Tabla 1 resume los datos obtenidos por CV donde se observa el aumento significativo en los picos de corriente anódica (I_{pa}) y catódica (I_{pc}) de los electrodos *SPE-Au* ($27,45 \pm 2,1 \mu\text{A}$ y $-28,01 \pm 1,1 \mu\text{A}$, respectivamente), comparado con los electrodos no modificados *SPE-C* ($16,13 \pm 1,4 \mu\text{A}$ y $-10,36 \pm 1,2 \mu\text{A}$, respectivamente).

El área electroquímicamente activa (A_{ea}) se calculó utilizando la ecuación de Randles-Sevcik con los valores de I_{pa} y I_{pc} obtenidos previamente. Los electrodos *SPE-Au* presentaron un valor A_{ea} promedio de $1,77 \pm 0,16 \text{ cm}^2$, siendo 2,5 veces mayor al reportado para los electrodos *SPE-C* ($0,7 \pm 0,1 \text{ cm}^2$). Adicionalmente, se observó una disminución en la diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p) de los electrodos modificados *SPE-Au* ($71,8 \pm 9,2 \text{ mV}$) comparado con los electrodos no modificados *SPE-C* ($262,7 \pm 35,7 \text{ mV}$).

SPE	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	ΔE_p (mV)	A_{ea} (cm^2)^a
SPE-C	$16,13 \pm 1,4$	$-10,36 \pm 1,2$	$262,7 \pm 35,7$	$0,7 \pm 0,1$ ^b
SPE-Au	$27,45 \pm 2,1$	$-28,01 \pm 1,1$	$71,8 \pm 9,2$	$1,77 \pm 0,16$

Tabla 1. Caracterización electroquímica por voltamperometría cíclica. Datos obtenidos de análisis por voltamperometría cíclica de los electrodos de carbono desnudos (*SPE-C*) y modificados con nanopartículas de oro (*SPE-Au*); corriente de pico anódica (I_{pa}) y catódica (I_{pc}), diferencial de potenciales pico-a-pico (ΔE_p), área electroquímicamente activa (A_{ea}). ^a Valor promedio entre el A_{ea} anódica y A_{ea} catódica. ^b Valor del A_e reportada por el fabricante (*ItalSens IS-C*, *PalmSens*). En la tabla se reporta el promedio de los valores obtenidos de 6 ensayos independientes (3 electrodos por ensayo).

Estos resultados están asociados con la electrodeposición de las *NPs-Au* en la superficie de los electrodos modificados (*SPE-Au*) y su efecto sobre la cinética de transferencia de electrones, tal y como se observó en los voltamperogramas cíclicos obtenidos en el ensayo, que presentan los picos de oxidación y reducción característicos del oro (Figuras 3A) y cuando se evaluó por CV la relación entre la intensidad del pico de

corriente anódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido evidenciando un proceso controlado por difusión (Figuras 3C y 3D).

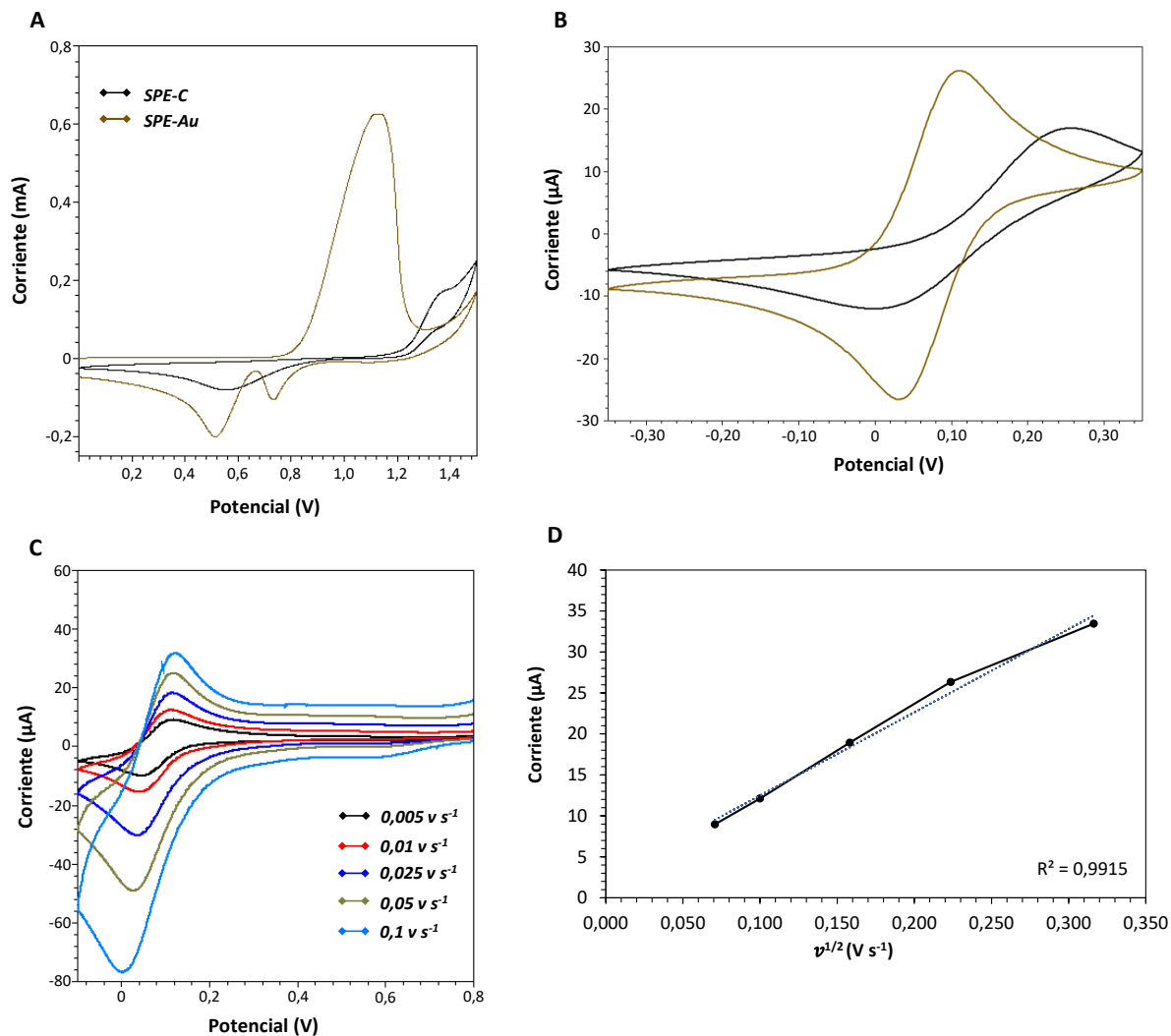


Figura 3. Caracterización electroquímica de electrodos modificados por voltamperometría cíclica.

Voltamperogramas cíclicos representativos de los electrodos de carbono (*SPE-C*) desnudos o modificados con nanopartículas de oro (*SPE-Au*) en solución 100 mM H₂SO₄ (A) ó 1 mM K₃[Fe(CN)₆], 1 mM K₄[Fe(CN)₆] en 0,1 M KNO₃, (B). Voltamperograma cíclico (C) y análisis de relación entre el pico de corriente anódica (I_{pa}) y la velocidad de barrido $v^{1/2}$ (V s⁻¹) (D) para los electrodos *SPE-Au*, bajo condiciones de reacción redox reversible 0,1 M KNO₃, 1 mM K₃[Fe(CN)₆], 1 mM K₄[Fe(CN)₆].

Funcionalización de electrodos modificados SPE-Au con anticuerpos anti-Histoplasma

Una vez verificada la modificación de los electrodos *SPE-Au*, se procedió con la funcionalización de los anticuerpos anti-*H. capsulatum* y el bloqueo con BSA de sitios inespecíficos sobre la superficie de los electrodos. Para corroborar este proceso se evaluó por EIS la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), modelando las propiedades eléctricas interfaciales del electrodo mediante un circuito equivalente (Figura 4A). En la figura 4B, se ilustra el diagrama de Nyquist representativo con la medición obtenida antes y después de la funcionalización de los electrodos.

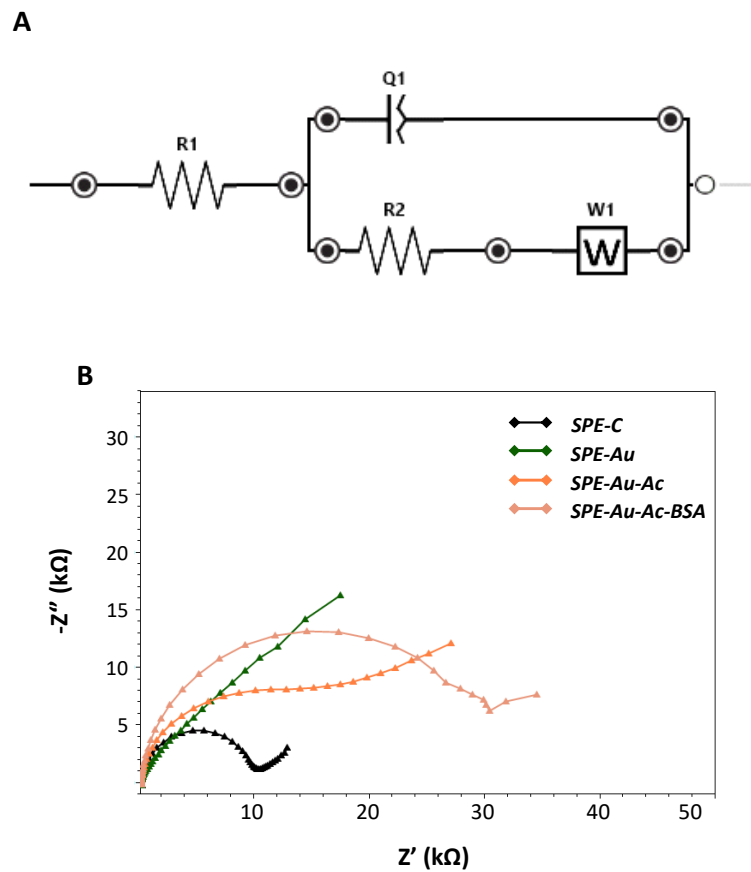


Figura 4. Caracterización electroquímica por espectroscopia de impedancia electroquímica de electrodos modificados y funcionalizados. (A). Esquema de circuito equivalente de Randles; resistencia de la solución electrolítica (R1), resistencia de transferencia de carga (R2), impedancia de Warburg (W1), elemento de fase constante (Q1). (B). Diagrama de Nyquist representativo de electrodos de carbono (*SPE-C*), modificados con nanopartículas de oro (*SPE-Au*), funcionalizados con anticuerpos anti-*H. capsulatum* [50 $\mu\text{g mL}^{-1}$] (*SPE-Au-Ac*) y bloqueados con BSA [1%] (*SPE-Au-Ac-BSA*).

La Tabla 2 muestra los valores promedios obtenidos durante los pasos de funcionalización y bloqueo, para cada uno de los anticuerpos: *anti-Ag212_Hc* y *anti-Ag670_Hc*. Como se observa, la adsorción de los anticuerpos y posteriormente del BSA incrementó el valor R_{ct} , comparado con el obtenido inicialmente en los electrodos sin funcionalizar. Esto debido al efecto barrera que ambas capas de proteína generan sobre la superficie del electrodo, disminuyendo su capacidad de transferencia de electrones.

SPE	R_s (k Ω) \pm % error	R_{ct} (k Ω) \pm % error	Z_w (Ω s ^{-0,5})	χ^2
SPE-C	0,27 \pm 0,01	10,95 \pm 0,03	2033 \pm 18,17	0,01
SPE-Au	0,21 \pm 0,01	2,74 \pm 0,02	7193 \pm 10,93	0,04
SPE-Au-Ac*	0,24 \pm 0,01	14,48 \pm 0,08	6251 \pm 15,18	0,02
BSA	0,27 \pm 0,01	33,87 \pm 0,07	4741 \pm 42,47	0,02

Tabla 2. Caracterización electroquímica por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Datos obtenidos de análisis por EIS de electrodos de carbono (*SPE-C*), modificados con nanopartículas de oro (*SPE-Au*), funcionalizados con anticuerpos anti-*H. capsulatum* (*SPE-Au-Ac*) y bloqueados con BSA (*SPE-Au-Ac-BSA*). Resistencia de la solución electrolítica (R_s), resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), impedancia de Warburg (Z_w), función chi-cuadrado (χ^2). * valor promedio obtenido con cada anticuerpo: *anti-Ag212_Hc* y *anti-670_Hc*. En la tabla se reportan los valores promedios obtenidos de 3 ensayos independientes (3 electrodos por ensayo) con cada anticuerpo.

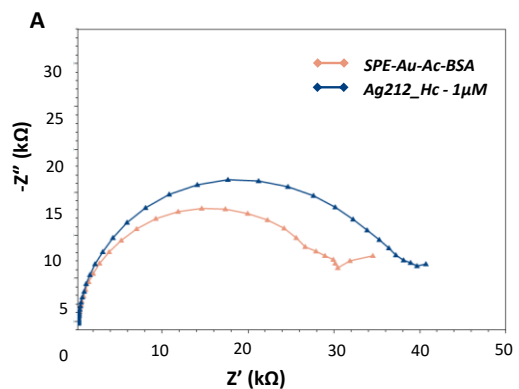
Detección electroquímica de antígenos de H. capsulatum

Una vez desarrollados los inmunosensores, se detectaron electroquímicamente los antígenos de *H. capsulatum*. Cada inmunosensor se expuso individualmente a alguna de las proteínas específica del hongo (*Ag212_Hc* y *Ag670_Hc*) y se midió la resistencia de transferencia de carga (R_{ct}) por EIS.

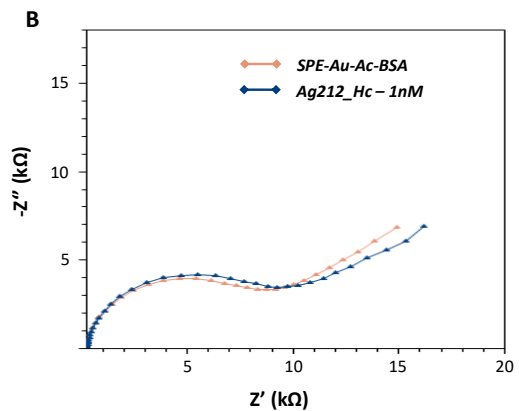
En el caso del *Ag212_Hc*, los ensayos se realizaron con dos concentraciones distintas, 1 μ M y 1nM. Para ambas concentraciones, se observó un aumento significativo del valor R_{ct} , comparado con el obtenido posterior al bloqueo con BSA, indicando la formación de una barrera proteica adicional sobre la superficie del electrodo modificado como resultado del reconocimiento del antígeno por parte de los anticuerpos policlonales anti-*H. capsulatum*

(Figuras 5A y 5B), demostrando así la funcionalidad del inmunosensor (interacción antígeno – anticuerpo).

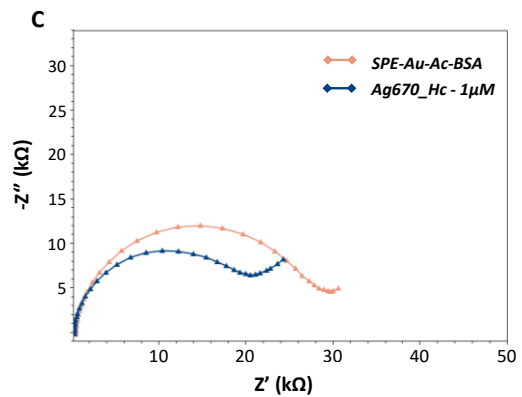
Sin embargo, en los ensayos de detección con el antígeno *Ag670_Hc* se presentó una disminución en los valores R_{ct} , que podrían señalar la posible remoción de la capa de proteínas (anticuerpos y BSA) presentes en la superficie del inmunosensor (Figura 5C). Ensayos adicionales con el buffer de almacenamiento usado con este antígeno (*Ag670_Hc*) mostraron valores de R_{ct} similares a los reportados previamente ($21,55 \pm 0,01$), confirmando la presencia de algún componente en el buffer con capacidad para afectar la integridad de las proteínas presentes en la superficie del electrodo. Sin embargo, a la fecha de este reporte no ha sido posible utilizar un buffer diferente para resuspender el antígeno *Ag670_Hc* durante su producción en el laboratorio.



	R_s (kΩ) ± % error	R_{ct} (kΩ) ± % error	Z_w (Ω s ^{-0,5})	χ^2
BSA	0,27 ± 0,01	33,87 ± 0,07	4741 ± 42,4	0,02
Ag212_Hc	0,27 ± 0,01	45,80 ± 0,08	4397 ± 48,8	0,02



	R_s (kΩ) ± % error	R_{ct} (kΩ) ± % error	Z_w (Ω s ^{-0,5})	χ^2
BSA	0,24 ± 0,01	13,85 ± 0,07	3766 ± 1,94	0,01
Ag212_Hc	0,24 ± 0,01	14,40 ± 0,08	3630 ± 2,67	0,01



	R_s (kΩ) ± % error	R_{ct} (kΩ) ± % error	Z_w (Ω s ^{-0,5})	χ^2
BSA	0,30 ± 0,01	28,98 ± 0,06	1774 ± 45,12	0,03
Ag670_Hc	0,25 ± 0,01	19,84 ± 0,09	3545 ± 17,04	0,02

Figura 5. Detección electroquímica de antígenos de *H. capsulatum*. Diagramas de Nyquist representativos de ensayos por EIS para la detección de antígenos *Ag212_Hc* (**A, B**) y *Ag670_Hc* (**C**). Concentración de antígenos a $1\mu\text{M}$ (**A, C**) y 1nM (**B**). Las tablas representan el análisis de datos obtenidos por EIS; resistencia de la solución electrolítica (R_s), resistencia de transferencia de carga (R_{ct}), impedancia de Warburg (Z_w), función chi-cuadrado (χ^2). Los valores representan promedios obtenidos de 3 ensayos independientes (3 electrodos por ensayo) con cada antígeno.

DISCUSIÓN

Aunque en los últimos años se ha visto un gran avance en los programas de control y prevención de las enfermedades infecciosas, el principal reto sigue estando relacionado con la identificación rápida y específica del agente causal de la infección y el inicio oportuno del tratamiento antimicrobiano que evite el desarrollo de complicaciones y la aparición de mecanismos de resistencia en el patógeno.

Como alternativa a esta problemática se han venido implementando nuevas tecnologías, incluyendo los biosensores electroquímicos, para el desarrollo de métodos diagnósticos tipo POC, capaces de ofrecer mejores rendimientos en términos de sensibilidad y especificidad, con tiempos de ensayo reducidos, más portables y fácilmente utilizables fuera del laboratorio, ya sea en la habitación del paciente o en consultorios de centros de salud de primer nivel de atención [15, 16].

Los biosensores electroquímicos emplean un electrodo como transductor de la señal, al cual se le acopla una molécula bioreceptora que reconoce y captura el biomarcador de interés. Actualmente, existen reportes sobre el desarrollo de este tipo de dispositivos para el diagnóstico de infecciones por bacterias (*Escherichia coli* [17], *Staphylococcus aureus* [18]), parásitos (*Trypanosoma* spp [19]) y virus (*Hepatitis B* [20], *VIH* [21], *SARS-CoV-2* [12, 22]). En el caso de las infecciones producidas por hongos, a la fecha solo se ha reportado dos estudios, uno publicado por Kwasny y colaboradores [24] en el cual se desarrolló un sensor electroquímico con capacidad para detectar hasta 10 UFC/ml de levaduras de *Candida albicans* mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), y otro publicado por Villamizar y colaboradores [24], quienes desarrollaron un biosensor basado en transistores de efecto de campo FET (del inglés, *Field effect transistor*) capaz de detectar hasta 50 UFC/ml de levaduras *C. albicans*.

En nuestro caso, para demostrar la interacción antígeno-anticuerpo de las moléculas diseñadas, sintetizadas y caracterizadas, descritas en el capítulo II de esta tesis, desarrollamos un prototipo beta de inmunosensor electroquímico, utilizando electrodos serigrafiados de carbono, modificados con *NPs-Au* y funcionalizados con los anticuerpos policlonales capaces de detectar los antígenos *Ag212_Hc* y *Ag670_Hc* específicos del hongo *H. capsulatum* que desarrollamos, mediante EIS, monitoreando los cambios en las propiedades eléctricas de la interfaz del biosensor durante el proceso de bioreconocimiento ligando-receptor (Figura 5A-C) [25-27].

Inicialmente, se logró demostrar la electrodeposición de las *NPs-Au* sobre la superficie de los electrodos, mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido

de electrones (Figuras 2F, 2G), el mapeo de la composición química elemental (Figura 2H). Además, se evidenció los picos característicos de la oxidación y reducción del oro por CV en H_2SO_4 (Figura 3A) y el aumento del área electroquímicamente activa (A_{ea}) en el electrodo de trabajo modificado con *NPs-Au* con respecto al electrodo de carbono desnudo (Figura 3B, Tabla 1). Estos resultados son comparables con los reportados en otros estudios [12, 28] y ponen de manifiesto el potencial de la plataforma transductora modificada para una vez funcionalizada con los anticuerpos desarrollados se ensamble un inmunosensor con características analíticas mejoradas.

En este contexto, la plataforma modificada con *NPs-Au* se funcionalizó con los anticuerpos anti-*H. capsulatum*, utilizando el protocolo previamente reportado por Echeverri y colaboradores [14] quienes demostraron que una solución de anticuerpo a $50 \mu g ml^{-1}$ durante 120 minutos de incubación es suficiente para asegurar la máxima adsorción de la molécula sobre la superficie del electrodo. La Figura 4 muestra la caracterización por EIS de los electrodos modificados y funcionalizados y el esquema del circuito equivalente de Randles (Figura 4A) que mejor representa el fenómeno físico de la interfaz electrodo – solución. Por ejemplo, la resistencia de la solución electrolítica (R1), la resistencia de transferencia de carga (R2), la impedancia de Warburg (W1) y el elemento de fase constante (Q1) que tienen en cuenta la alta rugosidad de la superficie electródica por la presencia de *NPs-Au*. El diagrama de Nyquist de la Figura 4B y la Tabla 2 muestran una disminución en la resistencia a la transferencia de carga de $10,95 \pm 0,03$ a $2,74 \pm 0,02$ k Ω después de electrodepositar las *NPs-Au* en la superficie del *SPE-C*. Esta impedancia aumenta dramáticamente a $14,48 \pm 0,08$ k Ω y $33,87 \pm 0,07$ k Ω después de funcionalizar con los anticuerpos y bloquear con 1% BSA, respectivamente, indicando la funcionalización apropiada de la superficie. Sin embargo, el aumento en los valores de R_{ct} en los electrodos funcionalizados y bloqueados con BSA es indicativo de la presencia de múltiples sitios de unión no específicos en los cuales no se adsorbió el anticuerpo. Teniendo en cuenta las diferencias fisicoquímicas entre un anticuerpo y otro, en términos de secuencia de aminoácidos, presencia de grupos funcionales y punto isoeléctrico, se podría plantear como perspectiva futura mejorar las condiciones del protocolo de funcionalización, de tal forma que se logre disminuir al mínimo la presencia de dichos sitios no específicos.

Como prueba de concepto inicial, se evaluó la capacidad de los inmunosensores para detectar los antígenos de *H. capsulatum* desarrollados. En un primer momento se verificó la

funcionalidad del sistema utilizando una concentración de antígeno a 1 μM . Específicamente, para el antígeno *Ag212_Hc*, las condiciones de reacción definidas fueron suficientes para observar una diferencia clara en la resistencia a la transferencia de carga de los electrodos cambiando de $33,87 \pm 0,07 \text{ k}\Omega$ con el electrodo funcionalizado a $45,80 \pm 0,08 \text{ k}\Omega$, por interacción con los antígenos, confirmando la formación del complejo antígeno-anticuerpo en el inmunosensor (Figura 5A). Posteriormente, se realizaron nuevos ensayos utilizando una solución del antígeno a 1 nM (equivalente a 80 ng/ml). Lo anterior, teniendo en cuenta los valores de rendimiento reportados en otros kits de diagnóstico tipo ELISA para la histoplasmosis (valor positivo desde 1,8 a 12 ng/ml) [29, 30]. Es importante resaltar, que la diferencia entre los valores reportados anteriormente estaría relacionada con las características biológicas de los antígenos blanco utilizados en cada técnica, incluyendo su tamaño y peso molecular (23,24 KDa para *Ag212_Hc*, 75,44 KDa para *Ag670_Hc* y 504 g/mol para galactomanano). En ese sentido, se podría estimar que para el caso del antígeno galactomanano, la concentración reportada en las muestras positivas estaría en un rango de concentración entre 3 nM a 12 nM. En nuestro caso, al utilizar una concentración de 1 nM se logró evidenciar un cambio en los valores de la resistencia a la transferencia de carga de $13,85 \pm 0,07 \text{ k}\Omega$ con el electrodo funcionalizado a $14,40 \pm 0,08 \text{ k}\Omega$ por interacción con los antígenos, indicando interacción antígeno – anticuerpo a pesar de la baja concentración del antígeno y por tanto el reconocimiento su reconocimiento por el inmunosensor (Figura 5B).

Por otro lado, para el caso del antígeno *Ag670-Hc*, los ensayos de detección indicaron un posible efecto de remoción de las proteínas previamente ancladas al electrodo (anticuerpos y BSA) (Figura 5C). Previos estudios han demostrado que es posible generar una disrupción, utilizando agentes surfactantes, como detergentes y otros compuestos orgánicos, los cuales tienen la capacidad de solubilizar e inestabilizar la integridad de ciertas proteínas, formando además una doble capa aislante sobre la superficie de los electrodos [31, 32]. En relación con lo anterior, el antígeno *Ag670_Hc* es una proteína recombinante previamente sintetizada y purificada en el laboratorio mediante un sistema de expresión procariota, utilizando protocolos que generan posiblemente la presencia de surfactantes en el buffer de purificación de la proteína. Este hecho se confirmó al obtener los mismos resultados cuando se realizaron ensayos utilizando únicamente el buffer de purificación y bajo las mismas condiciones de incubación del antígeno. Como perspectiva de esta parte del trabajo desarrollado se plantea la posibilidad de realizar ensayos adicionales de detección del antígeno *Ag670_Hc* después de someterlo a un protocolo diferente de purificación.

Sobre los antígenos utilizados para los ensayos de detección con el inmunosensor, *Ag212_Hc* y *Ag670_Hc*, es importante mencionar que, ambos se identificaron previamente como proteínas específicas para el hongo *H. capsulatum*, y como antígenos circulantes de pacientes con infección confirmada de histoplasmosis, según la evidencia experimental obtenida en reportes previos (datos sometidos a publicación que conforman el capítulo II del presente trabajo de tesis), razón por la cual tendrían el potencial para considerarse como biomarcadores específicos de histoplasmosis, y como blancos antigénicos durante el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico como el propuesto en el presente trabajo.

Finalmente, teniendo en consideración las limitaciones anteriormente mencionadas de los métodos de laboratorio convencional y de los biomarcadores de diagnóstico utilizados actualmente, con los resultados obtenidos en el presente estudio se demuestra el potencial de combinar estrategias de búsqueda e identificación de nuevos biomarcadores específicos de patógenos, con el desarrollo de nuevas herramientas tipo POC, como los inmunosensores, para el diagnóstico de enfermedades producidas por agentes infecciosos, como la histoplasmosis.

Como prueba de concepto, los electrodos se modificaron y funcionalizaron con una capa de anticuerpos policlonales anti-*H. capsulatum* para la detección del antígeno *Ag212_Hc* específico para el hongo *H. capsulatum*. Las condiciones establecidas en el laboratorio y la interacción antígeno – anticuerpo son prometedoras para desarrollar un inmunosensor para el diagnóstico de la histoplasmosis. Sin embargo, aún es necesario caracterizar analíticamente el inmunosensor, en términos de rango operativo de trabajo, límite de detección, sensibilidad, especificidad, selectividad y estabilidad en condiciones de almacenamiento en el laboratorio. Finalmente, en una etapa posterior también se plantea la validación clínica del inmunosensor para determinar su sensibilidad, especificidad clínica y precisión diagnóstica. Así mismo, se deben contemplar ensayos adicionales que validen los resultados preliminares, en los cuales se incluya el uso de muestras con diferente naturaleza biológica como orina, suero o biopsias obtenidas de pacientes con diagnóstico confirmado de histoplasmosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Liu Q, Jing W, Liu M, Liu J. Health disparity and mortality trends of infectious diseases in BRICS from 1990 to 2019. *J Glob Health*. 2022;12:04028. Epub 2022/04/01. doi: 10.7189/jogh.12.04028. PubMed PMID: 35356649; PubMed Central PMCID: PMC8943566 form (available upon request from the corresponding author) and declare no conflicts of interest.
2. Gil N, Montenegro A. Análisis de Situación de Salud (ASIS) Colombia. Dirección de Epidemiología: Ministerio de Salud y Protección Social; 2021.
3. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):115-32. Epub 2007/01/16. doi: 10.1128/CMR.00027-06. PubMed PMID: 17223625; PubMed Central PMCID: PMC1797635.
4. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Baddley JW, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007;45(7):807-25. Epub 2007/09/07. doi: 10.1086/521259. PubMed PMID: 17806045.
5. Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med*. 2012;9(9):e1001306. Epub 2012/09/14. doi: 10.1371/journal.pmed.1001306. PubMed PMID: 22973183.
6. Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, Raoult D. The Point-of-Care Laboratory in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):429-47. Epub 2016/04/01. doi: 10.1128/CMR.00090-15. PubMed PMID: 27029593; PubMed Central PMCID: PMC4861988.
7. Weiner RG, Tyler JK. The impact of point-of-care testing on the diagnosis of infectious diseases. *MLO Med Lab Obs*. 2003;35(8):36-7. Epub 2003/08/29. PubMed PMID: 12942660.
8. González-Sánchez MI, Gómez-Monedero B, Agrisuelas J, Iniesta J, Valero E. Highly activated screen-printed carbon electrodes by electrochemical treatment with hydrogen peroxide. *Electrochemistry Communications*. 2018;91:36-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.05.002>.

9. García-Miranda Ferrari A, Foster CW, Kelly PJ, Brownson DAC, Banks CE. Determination of the Electrochemical Area of Screen-Printed Electrochemical Sensing Platforms. *Biosensors* [Internet]. 2018; 8(2).
10. Konopka SJ, McDuffie B. Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. *Analytical Chemistry*. 1970;42(14):1741-6. doi: 10.1021/ac50160a042.
11. Menolasina S. Electrochemical studies of Fe(CN)₆⁴⁻/Fe(CN)₆³⁻ on gold ultramicroelectrodes varying the concentrations of KF as supporting electrolyte. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 2005;28:159-68.
12. Brazaca LC, Imamura AH, Gomes NO, Almeida MB, Scheidt DT, Raymundo-Pereira PA, et al. Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414(18):5507-17. Epub 2022/02/17. doi: 10.1007/s00216-022-03956-1. PubMed PMID: 35169906; PubMed Central PMCID: PMCPCMC8853172.
13. Cruz-Pacheco AF, Quinchia J, Orozco J. Cerium oxide-doped PEDOT nanocomposite for label-free electrochemical immunosensing of anti-p53 autoantibodies. *Mikrochim Acta*. 2022;189(6):228. Epub 2022/05/25. doi: 10.1007/s00604-022-05322-5. PubMed PMID: 35610491.
14. Echeverri D, Cruz-Pacheco AF, Orozco J. Capacitive nanobiosensing of β -1,4-galactosyltransferase-V colorectal cancer biomarker. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2023;374:132784. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132784>.
15. Sin ML, Mach KE, Wong PK, Liao JC. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014;14(2):225-44. Epub 2014/02/15. doi: 10.1586/14737159.2014.888313. PubMed PMID: 24524681; PubMed Central PMCID: PMCPCMC4104499.
16. Ozsoylu D, Wagner T, Schoning MJ. Electrochemical Cell-based Biosensors for Biomedical Applications. *Curr Top Med Chem*. 2022;22(9):713-33. Epub 2022/03/08. doi: 10.2174/1568026622666220304213617. PubMed PMID: 35249491.
17. Guo X, Kulkarni A, Doepke A, Halsall HB, Iyer S, Heineman WR. Carbohydrate-based label-free detection of *Escherichia coli* ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy.

Anal Chem. 2012;84(1):241-6. Epub 2011/11/01. doi: 10.1021/ac202419u. PubMed PMID: 22035288.

18. Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh DH. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. *Biosens Bioelectron.* 2018;105:49-57. Epub 2018/01/24. doi: 10.1016/j.bios.2018.01.023. PubMed PMID: 29358112.

19. Zelada-Guillen GA, Tweed-Kent A, Niemann M, Goringe HU, Riu J, Rius FX. Ultrasensitive and real-time detection of proteins in blood using a potentiometric carbon-nanotube aptasensor. *Biosens Bioelectron.* 2013;41:366-71. Epub 2012/09/29. doi: 10.1016/j.bios.2012.08.055. PubMed PMID: 23017685.

20. Qiu J-D, Huang H, Liang R-P. Biocompatible and label-free amperometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a sensing film composed of poly(allylamine)-branched ferrocene and gold nanoparticles. *Microchimica Acta.* 2011;174(1):97-105. doi: 10.1007/s00604-011-0585-4.

21. Shafiee H, Jahangir M, Inci F, Wang S, Willenbrecht RB, Giguel FF, et al. Acute on-chip HIV detection through label-free electrical sensing of viral nano-lysate. *Small.* 2013;9(15):2553-63, 478. Epub 2013/03/01. doi: 10.1002/sml.201202195. PubMed PMID: 23447456; PubMed Central PMCID: PMC3761882.

22. Ishikawa FN, Chang HK, Curreli M, Liao HI, Olson CA, Chen PC, et al. Label-free, electrical detection of the SARS virus N-protein with nanowire biosensors utilizing antibody mimics as capture probes. *ACS Nano.* 2009;3(5):1219-24. Epub 2009/05/09. doi: 10.1021/nn900086c. PubMed PMID: 19422193; PubMed Central PMCID: PMC2765574.

23. Kwasny D, Tehrani SE, Almeida C, Schjodt I, Dimaki M, Svendsen WE. Direct Detection of *Candida albicans* with a Membrane Based Electrochemical Impedance Spectroscopy Sensor. *Sensors (Basel).* 2018;18(7). Epub 2018/07/13. doi: 10.3390/s18072214. PubMed PMID: 29996525; PubMed Central PMCID: PMC6069365.

24. Villamizar RA, Maroto A, Rius FX. Improved detection of *Candida albicans* with carbon nanotube field-effect transistors. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2009;136(2):451-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.10.013>.

25. Suni II. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2008;27(7):604-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.03.012>.

26. Strong ME, Richards JR, Torres M, Beck CM, La Belle JT. Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021;177:112949. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112949>.
27. Magar HS, Hassan RYA, Mulchandani A. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors (Basel)*. 2021;21(19). Epub 2021/10/14. doi: 10.3390/s21196578. PubMed PMID: 34640898; PubMed Central PMCID: PMC8512860.
28. Schröper F, Brüggemann D, Mourzina Y, Wolfrum B, Offenhäusser A, Mayer D. Analyzing the electroactive surface of gold nanopillars by electrochemical methods for electrode miniaturization. *Electrochimica Acta*. 2008;53(21):6265-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.068>.
29. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA Histoplasma antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(6):802-3. Epub 2007/04/06. doi: 10.1128/CVI.00035-07. PubMed PMID: 17409220; PubMed Central PMCID: PMC1951085.
30. Connolly PA, Durkin MM, Lemonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. Detection of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(12):1587-91. Epub 2007/10/05. doi: 10.1128/CVI.00071-07. PubMed PMID: 17913863; PubMed Central PMCID: PMC2168386.
31. Balasubramanian S, Revzin A, Simonian A. Electrochemical Desorption of Proteins from Gold Electrode Surface. *Electroanalysis*. 2006;18(19-20):1885-92. doi: <https://doi.org/10.1002/elan.200603627>.
32. Sigal GB, Mrksich M, Whitesides GM. Using Surface Plasmon Resonance Spectroscopy To Measure the Association of Detergents with Self-Assembled Monolayers of Hexadecanethiolate on Gold. *Langmuir*. 1997;13(10):2749-55. doi: 10.1021/la961024f.

CAPÍTULO IV.

1. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral resaltan la importancia de implementar estrategias que combinen el uso de herramientas computacionales y el análisis e integración de datos ómicos (genómica, transcriptómica y proteómica), para la búsqueda, identificación y selección de nuevos biomarcadores, siendo éste uno de los primeros estudios enfocados en aplicar este tipo de estrategias para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico microbiológico para enfermedades infecciosas de importancia médica como la histoplasmosis.

A la fecha, se han logrado identificar al menos cinco proteínas específicas para el hongo *H. capsulatum*, tres de estas con evidencia experimental para considerarlas como antígenos circulantes en pacientes con histoplasmosis.

De igual forma, se estandarizó en el laboratorio un sistema de expresión de proteínas recombinantes y un esquema de inmunización en ratones para la producción rápida de anticuerpos policlonales, con los cuales se logró verificar experimentalmente los hallazgos obtenidos por el análisis bioinformático.

Adicionalmente, se demostró la presencia de los antígenos identificados en cultivos de levadura de *H. capsulatum* y en algunas muestras de orina de pacientes con diagnóstico de histoplasmosis, y se confirmó la especificidad de los anticuerpos purificados, siendo negativa su reactividad contra cultivos de *Candida albicans* y *Aspergillus* spp.

Finalmente, se demostró la capacidad de los anticuerpos policlonales desarrollados para reconocer antígenos específicos del hongo *H. capsulatum*, registrando la interacción antígeno – anticuerpo mediante una plataforma de prueba rápida tipo biosensor electroquímico, utilizando electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanopartículas de oro y funcionalizados con el anticuerpo policlonal.

Estos ensayos sirven como prueba de concepto inicial y brindan un primer acercamiento para el desarrollo de nuevos dispositivos con potencial aplicación para el diagnóstico de la histoplasmosis.

2. Perspectivas

Actualmente, es clara la importancia de afrontar las enfermedades infecciosas desde una perspectiva amplia, desarrollando estudios enfocados en mejorar los programas de prevención, los métodos de diagnóstico o los esquemas de tratamiento para dichas enfermedades.

En nuestro caso, se planteó el uso de una plataforma biotecnológica para la identificación, producción y validación en el laboratorio de nuevos biomarcadores de diagnóstico, la cual tiene el potencial para aplicarse en otros modelos de infección, y para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que, implementados adecuadamente tendrían un gran impacto en mejorar la calidad de vida de los pacientes. De hecho, teniendo en cuenta que durante el análisis bioinformático se incluyeron otros agentes fúngicos de importancia médica como *Candida* sp., *Aspergillus* spp. y *Pneumocystis jirovecii*, se podrían utilizar los datos obtenidos para iniciar la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico de infección para estos hongos.

Adicionalmente, y desde otra perspectiva, se podrían desarrollar nuevos estudios enfocados en evaluar la función de los antígenos aquí descritos, y de los cuales no se tiene conocimiento sobre el papel que cumplen durante el proceso de patogénesis de la histoplasmosis. Para ello, se podrían realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar el posible efecto de los antígenos sobre los procesos de reconocimiento, fagocitosis o destrucción de las levaduras de *H. capsulatum* y sobre el desarrollo de la respuesta inmune en el hospedero.

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta ahora, se podrá continuar con la validación analítica del inmunosensor para el diagnóstico de la histoplasmosis, consolidando una de las líneas de investigación del grupo dedicada al desarrollo y validación de pruebas rápidas tipo POC para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas producidas por hongos.

CAPÍTULO V.

1. Productos de investigación

1.1 Artículos científicos

como productos derivados de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se tiene sometido 1 manuscrito:

- *Identification and production of novel potential pathogen-specific biomarkers for diagnosis of histoplasmosis.* (Publicado, revista *Microbiology spectrum*)

Sobre los resultados relacionados con el objetivo específico 3.2.4 *Demostrar la interacción de los anticuerpos policlonales desarrollados frente a los antígenos de H. capsulatum mediante un prototipo beta de prueba rápida tipo POC*, estos serán incluidos en un próximo manuscrito (en preparación), una vez el inmunosensor se haya validado analíticamente.

1.2 Presentaciones en eventos académicos

Adicionalmente, con los resultados obtenidos en el presente trabajo se ha participado en los eventos académico-científicos listados a continuación:

- Infocus 2017, 15° Reunión de Expertos en Micología Clínica (Curitiba, Brasil).
Modalidad Poster.
Título: *A simple and efficient method of DNA extraction for molecular diagnosis of histoplasmosis*

- 16° Infocus 2018, Forum on fungal infection in the clinical practice (Cali, Colombia).
Modalidad Poster.
Título: *Identificación y selección de nuevos biomarcadores aplicados al diagnóstico de la histoplasmosis*

- Infocus 2021, 19° Reunión de Expertos en Micología Clínica (Córdoba, Argentina).
Modalidad Poster.
Título: *Protocolo general aplicado a la identificación y producción de nuevos biomarcadores con potencial uso para el diagnóstico de la histoplasmosis*

- ACIN 2022, XIII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas (Cali, Colombia).
Modalidad Oral.
Título: *Identificación de 2 nuevos biomarcadores específicos para la histoplasmosis con potencial aplicación en plataformas de inmunodiagnóstico*

- I al V Jornadas La Ciencia de los Doctores UPB, entre 2016 a 2022 (Medellín, Colombia)
Evento organizado por el programa de Doctorado en Ciencias Médicas (UPB).
Modalidad Oral.
Título: *Desarrollo de una prueba rápida tipo POC (point-of care) para el diagnóstico de la histoplasmosis: prueba de concepto*
Reconocimiento a mejor presentación en el marco de la III Jornada.

2. Financiación

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se contó con el apoyo de:

- Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación - MinCiencias, mediante la beca de financiamiento del Programa Nacional de Doctorado

- Universidad Pontificia Bolivariana, a través del programa de Doctorado en Ciencias Médicas

- Corporación para Investigaciones Biológicas, mediante el apoyo con recursos internos del Grupo de Micología Médica y Experimental.