

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD DE ROEDORES EN
EL VALLE DE LAS PALMAS COMO PORTADORES DEL
AGENTE CAUSAL DE LA COCCIDIOIDOMICOSIS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOVANI CATALÁN DIBENE

Ensenada, B.C.

Mayo de 2012

RESUMEN

“Caracterización de la comunidad de roedores en el Valle de las Palmas como portadores del agente causal de las coccidioidomicosis”

La coccidioidomicosis, también conocida como enfermedad del Valle de San Joaquín y fiebre del Valle, es una enfermedad infecciosa causada por dos especies de hongos ascomicetos dimórficos del género *Coccidioides*. La especie *C. immitis* parece estar confinada a la región central del Valle de San Joaquín (California, Estados Unidos y norte de Baja California) y *C. posadasii* se encuentra en regiones áridas del Suroeste de Estados Unidos (siendo las regiones más importantes el sur de California y Arizona), en el Norte de México (principalmente Sonora, Nuevo León, Coahuila y Baja California) y en Sudamérica (Argentina, Venezuela y Brasil). Se ha demostrado que el hongo crece en el suelo y sus artroconidios son dispersados por el viento y son los encargados de infectar principalmente a mamíferos. El aislamiento del hongo de muestras ambientales es difícil y presenta un riesgo de salud elevado. El porcentaje bajo de aislamientos puede deberse a que el nicho ecológico de este hongo no ha sido explorado en su totalidad, en particular en cuanto a su relación con otros organismos presentes en los hábitats. Se muestrearon roedores y se tomaron muestras de suelo en una región del Valle de las Palmas con reportes previos de personas infectadas por *Coccidioides* y detecciones moleculares del hongo en el suelo. Se capturaron e identificaron cuatro especies de roedores: *Peromyscus maniculatus*, *Neotoma lepida*, *Dipodomys simulans* y *Chaetodipus fallax*. Se extrajo el suero y pulmones a 40 roedores. El suero fue utilizado en pruebas de inmunodifusión en placa (IDCF) y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) y los pulmones fueron cortados y utilizados como inóculos para aislar *Coccidioides* de los tejidos. Se procesaron e inocularon 20 muestras de pulmón sin ningún resultado positivo. Las 40 muestras de suero extraídas de los roedores resultaron negativas por IDCF y cuatro individuos (dos *P. maniculatus* y dos *N. lepida*) resultaron seropositivos para antígeno extraído de *Coccidioides* (lisado de micelio por tolueno). Las muestras de suelo se utilizaron por un lado, para llevar a cabo la detección molecular de *Coccidioides* mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN total de extraído de suelo y por otro, para el aislamiento de cultivos vivos de *Coccidioides*. Quince de las 24 muestras resultaron positivas para la PCR anidada y dos cultivos recuperados se identificaron molecularmente como *Coccidioides*. Este estudio demuestra que Valle de las Palmas tiene las condiciones necesarias para el desarrollo del hongo en el suelo y que los roedores del área están expuestos al hongo y generan anticuerpos contra *Coccidioides*. Sin embargo, estudios más detallados sobre la relación de los roedores con el hombre son necesarios para acreditar o descartar cualquier rol que tengan los roedores en el desarrollo de *Coccidioides*.

Aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Directora de tesis

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD DE ROEDORES DEL VALLE DE LAS
PALMAS COMO PORTADORES DEL AGENTE CAUSAL DE LA
COCCIDIOIDOMICOSIS

TESIS

QUE, PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOVANI CATALÁN DIBENE

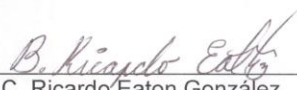
Aprobada por:



Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Presidente del jurado



Dra. Raquel Muñoz Salazar
Sinodal



M.C. Ricardo Eaton González
Sinodal

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Ecología de <i>Coccidioides</i>	11
2.1.1 Relaciones bióticas	18
2.2 Área de estudio	19
2.3 Aspectos clínicos y de diagnóstico	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPOTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivos generales	29
5.2 Objetivos específicos	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Muestreo en campo	30
6.1.2 Muestras de suelo	34
6.2 Ensayo de inmunodifusión	34
6.3 Obtención de antígeno	35
6.4 ELISA	35
6.5 Cultivos	37
6.6 Extracción de ADN	38
6.7 Identificación molecular	39

6.7.1 ADN total de suelo	39
6.7.2 ADN de colonias aisladas	41
6.7.3 Secuenciación	42
6.8 Procedimientos de bioseguridad	42
7. RESULTADOS	44
7.1 Muestreo en campo	44
7.2 Aislamiento de colonias e identificación molecular	52
7.2.1 Aislamiento de colonias a partir de pulmones	52
7.2.2 Muestras de ADN total de suelo	54
7.2.3 Muestras de ADN genómico de colonias aisladas	57
7.3 Inmunoensayos	60
7.3.1 Inmunodifusión	60
7.3.2 ELISA	62
8.DISCUCIONES	65
9. CONCLUSIONES	76
11. BIBLIOGRAFÍA	78
12. ANEXO	89

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pie de figura	Pág.
Figura 1	Distribución y relaciones filogenéticas de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i> en el continente americano. Modificado de Taylor y Fisher (2003).....	2
Figura 2	Ciclo dimórfico de <i>Coccidioides</i> . El ciclo sexual de este organismo es desconocido. Modificado de Kirkland y Fierer (1996).....	4
Figura 3	Coincidencias entre el modelo GARP y datos epidemiológicos georreferenciados. Modificado de Baptista-Rosas y colaboradores (2007).....	7
Figura 4	Panorámica de la zona de muestreo en Valle de Las Palmas. Se encuentra en una región rodeada de casas y ranchos habitados todo el año (Junio de 2010).....	21
Figura 5	Área de muestreo considerada para la primer salida de campo (circulo rojo) de 314 Ha. El polígono delimitado en blanco corresponde al Rancho Puerta de Gorriones.....	32
Figura 6	Temperaturas máximas, mínimas y medias mensuales, así como la precipitación total mensual para Valle de las Palmas, Baja California, México. Datos tomados del Sistema de Información para el Manejo de Agua de Riego en Baja California (SIMARBC).....	45
Figura 7	Abundancia y diversidad para cada zona de muestreo por salida de campo. La segunda y tercera salida de campo solo se llevo a cabo en la Zona 3.....	47
Figura 8	Especies de roedores capturados en VDP durante las tres salidas de campo.....	51
Figura 9	Pulmones troceados y usados como inóculo en medio Sabouraud (Cloranfenicol y Ciclohexamida) después de 2 semanas de incubación.....	53
Figura 10	Gel de agarosa (2%) donde se muestran las reacciones de la 3era PCR anidada de las muestras de ADN genómico total extraído del suelo. Donde MPM es el marcador de peso molecular, los 0 corresponden a los blancos, los signos – corresponden a los controles negativos y los signos + corresponden a los controles positivos, los signos entre () indica que dichos controles han sido acarreados desde la primera reacción. Los números indican la estación de donde fue tomada la muestra, la muestra 24 no se muestra pero fue negativa.....	55

Figura 11	Ejemplo de alineamiento resultante del BLAST. Las líneas designadas como <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i> ITS corresponden a las secuencias parciales de la región ITS 1 y 2 de esas especies con números de acceso NCU EF186789.1 y EF186786.1 respectivamente; la línea designada como Estación 1 corresponde a la muestra del carril 1 en la Figura 7, tomada en la estación de muestreo 1 (Tabla II).....	56
Figura 12	Morfología de las colonias y resultado de la PCR diagnóstica de Coccidioides. A) Morfología del aislado 6 correspondiente a <i>Aspergillus alliaceus</i> . Nótese que se observa una morfología similar a la descrita para Coccidioides. B) Morfología del aislado 11-2 correspondiente a Coccidioides spp. C) Gel de agarosa (2%) mostrando los amplicones obtenidos de la extracción de ADN de las colonias aisladas de las muestras de suelo. Donde MPM corresponde al marcador de peso molecular, 0 corresponde al blanco, el signo – corresponde al control negativo y el signo + corresponde al control positivo. Las muestras 11 y 11-2 corresponden a dos colonias diferentes aisladas de la misma muestra de suelo.....	58
Figura 13	Ejemplo de placa de IDCF los signos + representan los controles positivos (suero positivo), las marcas 1+4, 1-5, 1-6 y 1-8 corresponden a muestras de suero de roedores capturados.....	61
Figura 14	Gráfica de absorbancias corregidas. En la Tabla III se indica el número de muestra, la absorbancia y la especie asociada a cada muestra. La absorbancia promedio de los negativos fue gráficamente como referencia para cada ensayo.....	63
Figura 15	Árbol filogenético de máxima similitud construido utilizando 6 genes nucleares. Los recuadros rojos indican los clados donde se encuentran los roedores muestreados en este trabajo, <i>P. maniculatus</i> y <i>N. lepida</i> son miembros de la Familia Muridae al igual que el ratón común y la rata (<i>Mus</i> y <i>Rattus</i>), mientras que <i>D. simulans</i> y <i>C. fallax</i> son de la Familia Heteromyidae. Modificado de Blanga–Kanfi et al. 2009.....	70
Figura 16	Alineamiento de las regiones parciales ITS de <i>A. canadensis</i> (AJ439435.1), <i>A. pinarensis</i> (AJ439433.1), <i>Chrysosporium</i> sp. (FJ430724.1), <i>U. orisii</i> (AJ390393.1), <i>Penicillium</i> sp. (GQ370373.1), <i>C. immitis</i> (EF186789.1), <i>C. posadasii</i> (EF186786.1) y el fragmento obtenido de la PCR anidada de la muestra de suelo tomada en la estación 1 de muestreo (E1 ITS2). La flecha indica un salto en la secuencia para mostrar los fragmentos amplificados por la PCR anidada y los recuadros negros indican la posición de los oligonucleótidos sentido y antisentido usados para la PCR diagnóstico.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

	Leyenda	Página
Tabla I	Índices de Sorensen y Morisita para cada zona. En las salidas 2 y 3 solo se muestreo la Zona 3	48
Tabla II	Especies capturadas en Valle de las Palmas y sus frecuencias relativas.	50
Tabla III	Estaciones de muestreo, localización geográfica y resultados obtenidos para cada estación.	59
Tabla IV	Muestras graficadas en la Figura 12.	64

1. INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis (CM), también conocida como enfermedad del Valle de San Joaquín y fiebre del valle, es una enfermedad infecciosa causada por dos especies de hongos ascomicetos dimórficos del género *Coccidioides*. La especie *C. immitis* se ha aislado de la región central del Valle de San Joaquín (California, Estados Unidos) y *C. posadasii* se encuentra en regiones áridas del Suroeste de Estados Unidos (siendo las regiones más importantes el sur de California y Arizona), en el Norte de México (principalmente Sonora, Nuevo León, Coahuila y Baja California) y en Sudamérica (Argentina, Venezuela y Brasil) (**Figura 1**; Baptista-Rosas *et al.* 2007). Ambas especies presentan una morfología idéntica; sin embargo, *C. posadasii* crece lentamente en medios con alta salinidad. Hasta el momento la única manera confiable de distinguir entre ambas especies es haciendo uso de microsatélites o identificando polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs; Fisher *et al.* 2002).

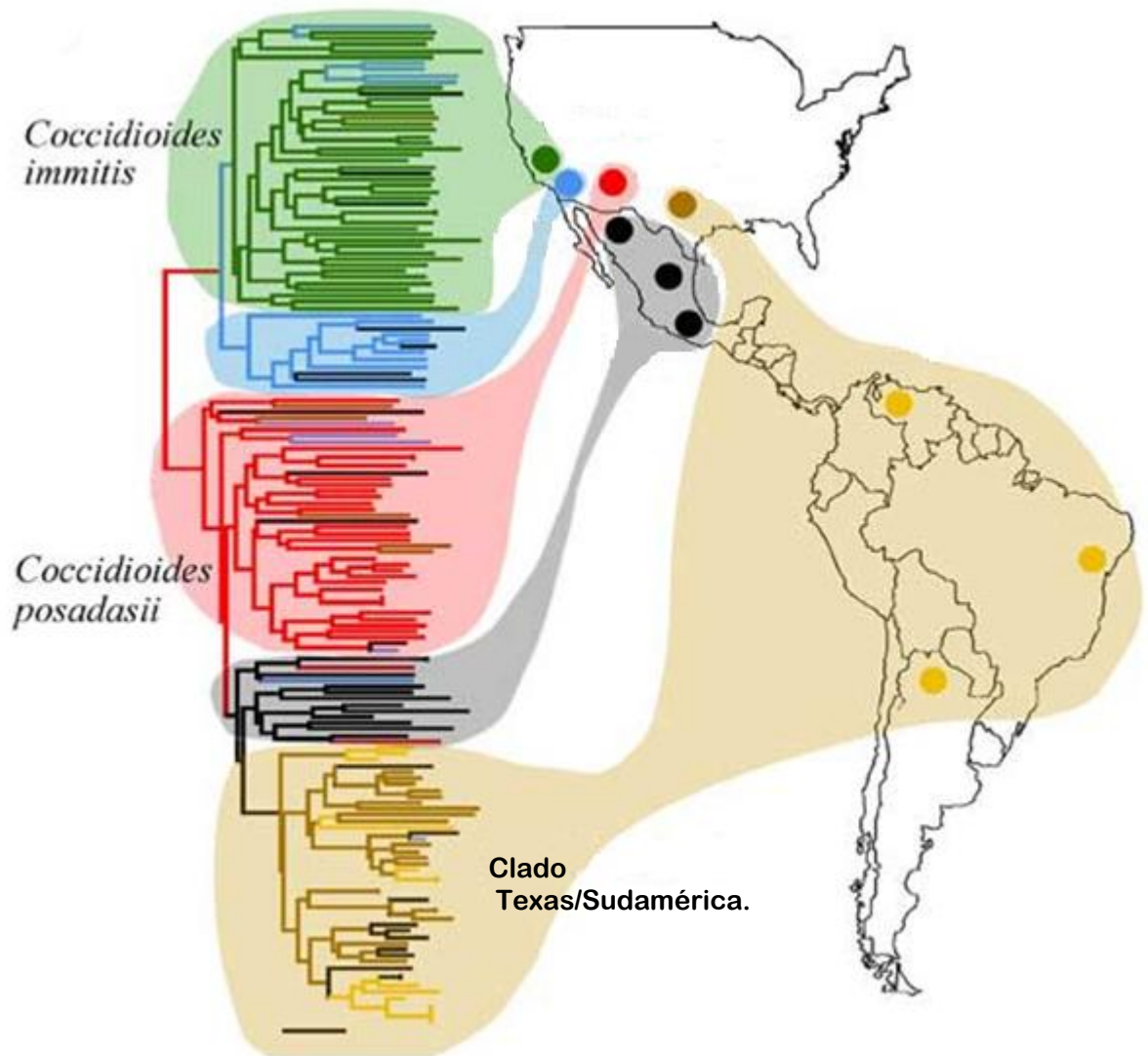


Figura 1. Distribución y relaciones filogenéticas de *C. immitis* y *C. posadasii* en el continente americano. Modificado de Taylor y Fisher (2003).

Coccidioides infecta principalmente mamíferos. La fiebre del Valle no puede ser transmitida por contacto entre pacientes o animales infectados, ni por un vector. El hospedero solo puede contraer la enfermedad por inhalación de artroconidios. Una vez inhalados, éstos ocasionan una infección pulmonar primaria caracterizada por la formación de esférulas con endoesporas en su interior que se pueden diseminar por el torrente sanguíneo a diferentes tejidos y órganos (**Figura 2**). Cerca del 60% de los casos son asintomáticos, y de esos sólo el 1% presenta complicaciones. La enfermedad puede tomar forma de una neumonía de leve a severa y si se disemina, toma forma de una enfermedad sistémica o una enfermedad crónica severa que generalmente termina en la muerte del paciente (Park *et al.* 2005; Einstein y Royce 1993; Baptista-Rosas *et al.* 2007; Valley Fever Center 2010; Center for Disease Control and Prevention 2009).

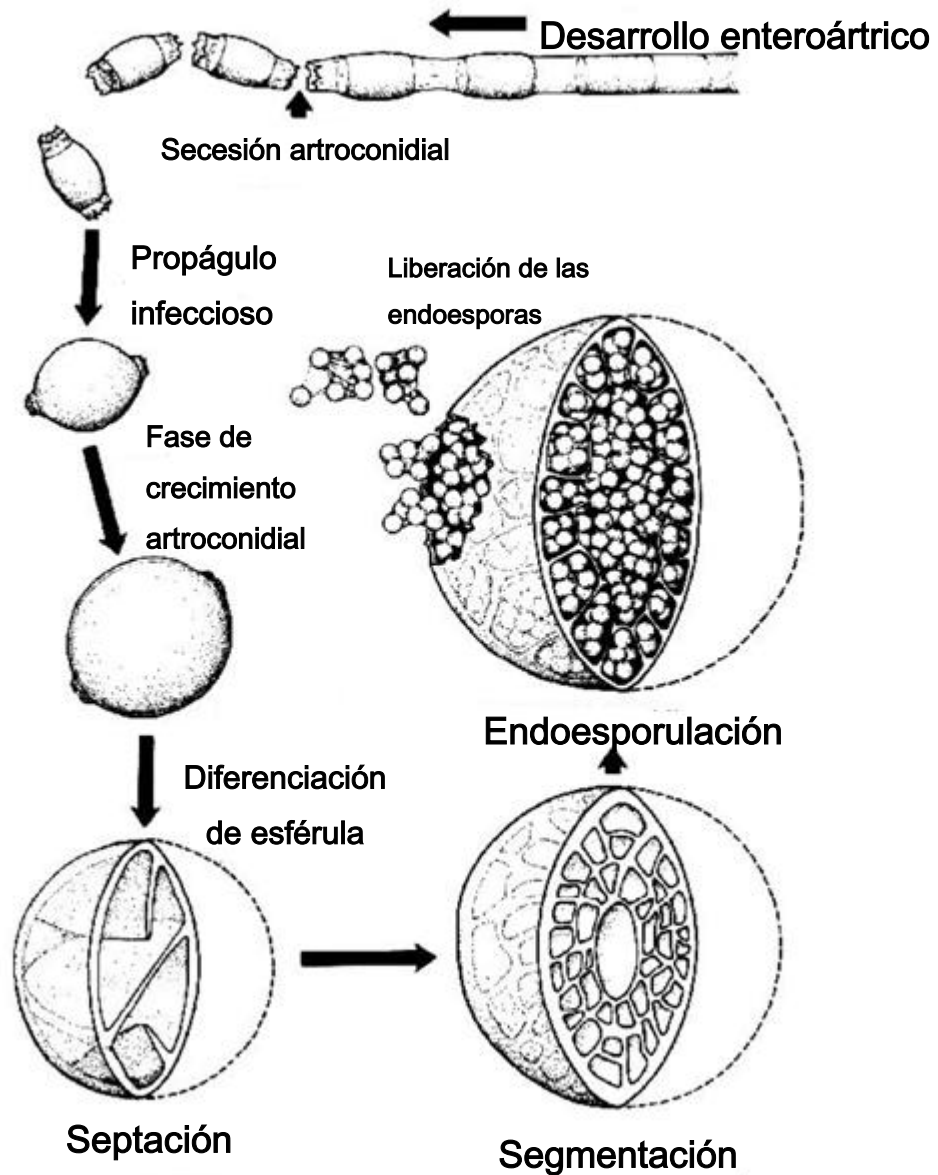


Figura 2. Ciclo dimórfico de *Coccidioides*. El ciclo sexual de este organismo es desconocido. Modificado de Kirkland y Fierer (1996).

La CM es una enfermedad auto limitada, puede llegar a manifestarse solo como un resfriado y entrar en remisión, tras lo cual se adquiere inmunidad sin necesidad de tratamiento, esto ocurre en 50-75% de los pacientes (Galgiani *et al.* 2005). Sin embargo en algunos pacientes la forma crónica de la enfermedad se puede presentar hasta 20 años después de haber estado en contacto con los artroconidios. El diagnóstico se da generalmente por observación directa de las esférulas en biopsias de pulmón o de lesiones cutáneas típicas de la enfermedad. Aunque también se pueden utilizar métodos como la reacción en cadena de la polimerasa e inmunología para confirmar el diagnóstico (Maddy *et al.* 1960; Millar *et al.* 2003; Fisher *et al.* 2002; Fisher *et al.* 1999; Galgiani *et al.* 2005). Una vez diagnosticada, la enfermedad es tratada con anfotericina B para casos agudos de coccidioidomicosis pulmonar mientras que los azoles como fluconazol y ketoconazol son usados para casos crónicos menos agresivos.

Se ha estimado que en los Estados Unidos ocurren 150,000 casos anualmente, el triple de los casos que se reportaron en 1995 (Center for Disease Control and Prevention, 2009). En Kern County, California se reportaron tasas de 195 casos por cada 100,000 habitantes entre 2000-2007 (Center for Disease Control and Prevention 2009). En México, no existen datos actuales sobre la epidemiología de *Coccidioides* spp. debido a que no es obligatorio reportar los casos en la Carta Epidemiológica Nacional. Sin embargo, estudios recientes realizados en el país han resultado en la modelación del posible nicho ecológico del patógeno, y en la identificación de

regiones donde es más probable que se desarrolle *Coccidioides* spp. y por lo tanto se reporten casos de la enfermedad (**Figura 3**) (Baptista-Rosas *et al.* 2007).

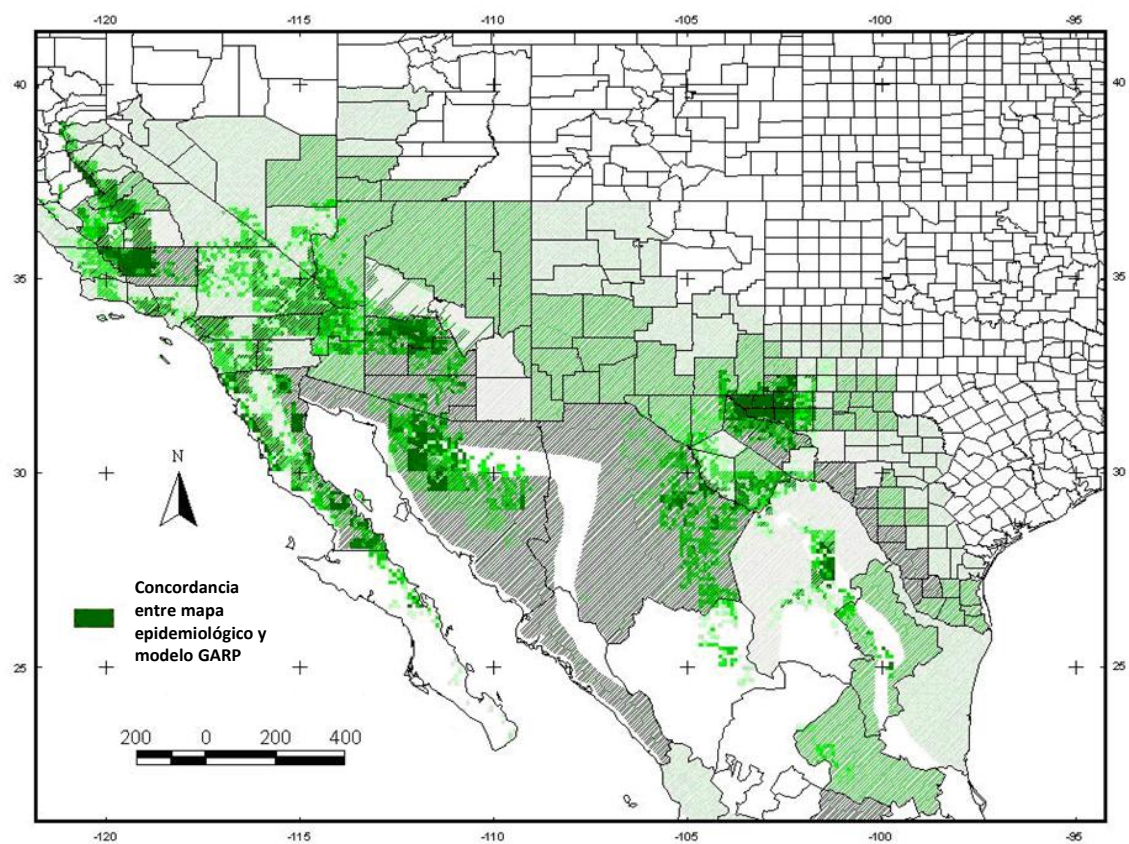


Figura 3. Coincidencias entre el modelo GARP y datos epidemiológicos georreferenciados. Modificado de Baptista-Rosas y colaboradores (2007).

En contraste con el número de aislamientos clínicos, los aislamientos ambientales han sido pocos. El primer aislamiento ambiental de *C. immitis* fue obtenido en 1932 por Stewart y Meyer. No obstante los métodos utilizados en 1932 y en los años subsecuentes (Omienyczynsky y Swatek 1967) requirieron la infección de ratones o conejillos de indias para el aislamiento de las colonias (Greene 2000; Elconin *et al.* 1964). Sin embargo, la utilización de organismos vivos como medio de aislamiento de un patógeno selecciona sólo aquellos organismos de mayor virulencia, característica que varía entre cepas de una misma especie de patógenos y genéticamente una especie puede ser más vulnerable a ciertos patógenos, lo cual no es muy útil para estudios sobre la ecología de un patógeno (Friedman *et al.* 1956; Kirkland y Fierer 1996). El desarrollo de la biología molecular permitió resolver estos problemas mediante el diseño de oligonucleótidos para amplificar secuencias específicas de *Coccidioides* spp. como es el caso de los espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (ITS por sus siglas en inglés) y ADNr 18S. Estos trabajos son de gran importancia ya que se conoce mucho más de la enfermedad coccidioidomicosis que de la biología del género *Coccidioides*. El uso del ADN como herramienta de estudio ha permitido clasificar y dividir en dos especies al género *Coccidioides*, así como identificar sus “parientes” más cercanos (Pan *et al.* 1994; Koufopanou *et al.* 2001; Fisher *et al.* 2002). Sin embargo, a pesar de los estudios moleculares y clínicos, no se ha logrado descifrar el ciclo de vida completo ni el nicho ecológico que tiene esta especie, y solo se conoce el ciclo asexual (**Figura 2**). El estudio del genoma de *Coccidioides* ha revelado la

existencia de reproducción sexual en su ciclo de vida; el estadio sexual ha evadido a los microbiólogos desde su descubrimiento y se creía en la posibilidad de que *Coccidioides spp.* fuera una especie asexual, sin embargo, con el análisis de polimorfismos de una sola cadena (SSCP por sus siglas en inglés) se encontró a nivel molecular que hay evidencias de que el hongo se encuentra en recombinación constante (Burt *et al.* 1996) y que además existen dos poblaciones aisladas sexualmente (*i.e.* endogámicas): la población de California y la población no californiana (Koufopanou *et al.* 1997); sin embargo, Barker y colaboradores (2012) han encontrado evidencia de que dentro de las poblaciones de *C. immitis* y *C. posadasii* existen subpoblaciones que no están aisladas sexualmente, como las subpoblaciones que se encuentran en México y San Diego. Recientemente en 2007 Mandel y colaboradores analizando el ADN genómico identificaron los genes sexuales *MAT1-1* y *MAT1-2*, los cuales se encuentran en la mayoría de los ascomicetos y que además estos se transcriben, evidenciado por la presencia de ARNm correspondiente a los genes *MAT1* predichos para *Coccidioides* (Mandel *et al.* 2007). A pesar de estos descubrimientos no se ha logrado que el hongo se reproduzca sexualmente en el laboratorio.

En cuanto a su ecología, su nicho no ha sido descrito en su totalidad. El nicho ecológico es la función que desempeña una especie en su ecosistema (Hutchinson, 1957). Este concepto permite describir como una especie responde a cambios ambientales, competencia, disponibilidad y distribución de

recursos. El estudio del nicho ha permitido identificar procesos necesarios y organismos involucrados en la virulencia, así como la distribución geográfica potencial de patógenos como *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, mal de Chagas y malaria por mencionar algunos (Nielsen *et al.* 2007; Peterson *et al.* 2002; Peterson y Shaw 2003). En estudios previos se han logrado identificar los factores físicos necesarios para la distribución de *Coccidioides* spp., sin embargo no se sabe mucho acerca de las interacciones que este hongo tiene con otras especies (Baptista-Rosas *et al.* 2007; Fisher *et al.* 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 Ecología de *Coccidioides*

La epidemiología es el estudio de los factores que propician la aparición de una enfermedad. La epidemiología no solo estudia al huésped y al parásito, también trata de estudiar todos los factores físicos y biológicos que determinan que un organismo se vea afectado. Así podríamos decir que al estudiar la epidemiología de un organismo patógeno estamos en gran medida estudiando su ecología. La ecología por su parte se encarga de estudiar la relación que tiene un organismo con su medio ambiente y otros organismos, como lo es la interacción entre huésped y parásito.

Cuando aparece una enfermedad o aumenta la incidencia de una enfermedad dentro de una población, el primer paso para el control de la misma es saber el origen del patógeno, de que se alimenta, como se alimenta, cuál es su frecuencia, y como se distribuye. Estos interrogantes pueden ser contestados estudiando al patógeno antes de que ocurra la infección. Estudios de este tipo han logrado deducir que en el caso de patógenos oportunistas como *Candida albicans* se requiere un cambio tanto en el tejido donde se encuentra como en la microbiota que lo acompaña en las mucosas para que este hongo pueda infectar (Marples, 1966; Savage, 1969). En estudios sobre la ecología de levaduras presentes en mucosas animales se encontró que una gran cantidad de mamíferos tanto silvestres como domésticos son portadores

de la forma saprobia de *C. albicans* en Nueva Zelanda y se demostró también que la dieta de estos animales influye en la presencia de levaduras en las mucosas (Van Uden, 1960; Marples, 1961). Estos hallazgos derivados del estudio ecológico de las levaduras probaron ser de importancia para la prevención y tratamiento de la candidiasis.

El caso de *Coccidioides* es diferente al de *Candida* ya que *Coccidioides* no es fácil de aislar de muestras ambientales. El agente causal de la enfermedad fue descrito como patógeno fúngico en 1900 (Ophulus y Moffitt) y en 1932 (Stewart y Meyer) se aisló del suelo por primera vez. En México hasta 1970 (Swatek) sólo se había obtenido un aislamiento de suelo en el estado de Sonora (Ochoa, 1967). En contraste, los aislamientos clínicos son substancialmente mayores. Aunque los esfuerzos por encontrar *Coccidioides* en el suelo han sido varios, solo se han obtenido números proporcionalmente bajos de muestras positivas a pesar de ser muestreos en zonas altamente endémicas (Stewart y Meyer, 1932; Emmons, 1942; Swatek, 1970; Greene, 2000; Barker *et al.* 2012). Esto ha hecho que descifrar el nicho de *Coccidioides* cuando se encuentra en el suelo sea complicado. Durante los primeros estudios sobre la ecología de *Coccidioides*, se asoció la presencia del hongo con la de ciertos tipos de vegetación, específicamente con el arbusto xerófito *Larrea tridentata* (Gobernadora), una planta muy común en el desierto sonorense, ya que en muestreos realizados en 1957 (Maddy) se encontró que la tierra formando los montículos debajo de individuos de esta gobernadora albergan al hongo. A

pesar de estos estudios, en análisis posteriores se ha encontrado que esta asociación no es acertada debido a que se han obtenido muestras positivas de tierra en áreas de chaparrales, pastizales y vegetación mediterránea además de muestras de suelo de desierto sonorense (Swatek, 1970; Fisher, 2007).

Los requerimientos físicos para el crecimiento de *Coccidioides* spp. han sido estudiados extensivamente en la búsqueda del hábitat de la especie, ya que el hábitat comprende una parte importante del nicho. Con los múltiples aislamientos ambientales obtenidos se han logrado identificar dos tipos de áreas donde está presente *Coccidioides*: sitios de crecimiento y sitios de acumulación. Los sitios de crecimiento son aquellos en los que se dan todas las condiciones necesarias para que se desarrolle el ciclo de vida del organismo, mientras que los sitios de acumulación son los sitios donde se depositan los artroconidios en la tierra por aire, agua o cualquier otro medio de dispersión. Estos últimos pueden convertirse en sitios de crecimiento. En cualquier caso, ambos sitios son potencialmente infectivos (Fisher *et al.* 2007).

Entre los factores clave determinantes del crecimiento de *Coccidioides* se encuentran: la tasa de precipitación anual, humedad de suelo, temperatura del suelo, textura, pH (alcalino), salinidad, contenido orgánico, ecología microbiana del suelo, presencia de boratos y presencia de madrigueras de roedores (Maddy, 1957; Egeberg, 1962; Swatek, 1970; Pappagianis, 1988). Las zonas endémicas en México están repartidas principalmente entre zonas con clima seco como lo es el desierto sonorense y climas mediterráneos como el norte de

Baja California, regiones que tienen en común temperaturas altas y tasas de precipitación anual bajas.

La presencia de agua es un factor clave para la proliferación de *Coccidioides* en el suelo. La presencia de agua en el suelo está determinada por diversos factores. Los patrones de lluvia y la cantidad de precipitación anual son los encargados de proveer agua y la cantidad de lluvia puede ser indicador temprano de un posible brote de coccidioidomicosis (Comrie, 2005). Sin embargo, lo más importante es la cantidad de agua que logre infiltrarse a las capas de tierra donde crece *Coccidioides*, que depende de factores topológicos y edafológicos. En terrenos con pendientes empinadas la infiltración de agua suele ser poca, mientras que en llanuras o depresiones el agua se retiene más tiempo aumentando así la infiltración. La infiltración también depende de la capacidad de saturación del suelo, la cual está dada por la porosidad del suelo. La porosidad depende del tamaño de las partículas (textura), *i. e.* entre más pequeñas las partículas menos infiltración ocurre. Se ha observado que *Coccidioides* crece en suelos principalmente arenosos, es decir de baja retención de agua, y en zonas riparias de gran capacidad de infiltración (dentro o alrededor) donde no hay saturación constante (Plunkett y Swatek, 1957; Swatek *et al.* 1967; Swatek, 1970; Fisher *et al.* 2007). Esto señala que *Coccidioides* prefiere suelos secos y de alta infiltración aprovechando su crecimiento hifoide para aprovechar el agua que se acumula entre las partículas de suelo después de las lluvias. Swatek (1975) señala que la humedad (en

tierra) necesaria para el crecimiento de *Coccidioides* es de 56% y 96% por varias semanas ya que Friedman y colaboradores (1956) encontraron que los artroconidios son viables por 6 meses a temperaturas que van desde 15 a 36°C con humedades relativas mayores de 10% y menores a 95%. En condiciones de poca humedad y altas temperaturas se observó una importante pérdida de la viabilidad (10% a 36°C). Fisher y colaboradores (2007) señalan que la humedad relativa de la tierra y de la atmosfera en zonas áridas pueden ser muy dispares, mientras que se registra una humedad relativa en suelo de 85%, la humedad atmosférica se registra al 15% (Cameron, 1966).

Otro factor importante para el crecimiento de *Coccidioides* en el medio natural es la temperatura. Al igual que la humedad, la temperatura ambiental y la temperatura de la tierra varían en gran medida. La temperatura a nivel del suelo es considerablemente mayor a la ambiental y considerablemente menor entre 2 y 20 cm de profundidad. Existen diversos factores que afectan la temperatura del suelo entre ellos se encuentran la posición geográfica, orientación, cobertura vegetal, nubosidad, humedad, color y contenido orgánico. En estudios realizados por Fisher y colaboradores en el 2007 se encontró en varios puntos de muestreo dentro de la zona endémica de *Coccidioides* que las temperaturas a nivel del suelo eran $\geq 20^{\circ}\text{C}$ mientras que a profundidades de entre 2 cm y 20 cm eran $\geq 10^{\circ}\text{C}$. Los mismos autores reportan que *Coccidioides* cae dentro de seis regímenes de temperatura de suelo en siete puntos de muestreo distribuidos en California, dos en Utah y uno en Arizona, todos en

zonas endémicas de *Coccidioides* dentro de Estados Unidos. El primer régimen consta de temperaturas $>55^{\circ}\text{C}$ y es letal para los artroconidios en poco tiempo; el segundo régimen de $40\text{-}55^{\circ}\text{C}$ es limitante en las temperaturas más altas; el tercer régimen $20\text{-}40^{\circ}\text{C}$ es óptimo para el desarrollo de *Coccidioides*; el cuarto régimen de $4\text{-}20^{\circ}\text{C}$ solo es limitante en las temperaturas más bajas; en el quinto régimen de $0\text{-}5^{\circ}\text{C}$ los artroconidios permanecen latentes pero viables; y en el sexto $>0^{\circ}\text{C}$ los artroconidios son viables pero probablemente sea letal si hay congelamiento. Es importante destacar que en los sitios muestreados, a 2 y 20 cm de la superficie se registraron regímenes favorables para el crecimiento de *Coccidioides* durante gran cantidad de horas (Fisher *et al.* 2007).

Como se mencionó anteriormente la humedad y la temperatura dependen de la textura de los suelos. Sin embargo, la textura no solo afecta la humedad y la temperatura, sino también la cantidad de nutrientes disponibles, al estar compuestos por minerales, algunos pueden ser directa o indirectamente de gran importancia nutrimental. Los suelos donde se encuentra *Coccidioides* caen dentro de la categoría de arenas francas o francos arenosos, los cuales tienen poca retención de agua y son susceptibles a la erosión, perfecto para la dispersión de *Coccidioides* (Fisher *et al.* 2007). Estas tierras están constituidas principalmente por cuarzo (SiO_2), el cual es inerte, y pequeñas cantidades de otros silicatos. Este tipo de suelos es poco favorable para mantener ecosistemas microbióticos robustos (Fisher *et al.* 2007). Por ser tierras francas, éstas contienen cantidades equilibradas de arena, limo y arcilla. De éstos el

limo y la arcilla son los más importantes para mantener la vida microbiana gracias a sus compuestos reactivos con materia orgánica (la arcilla en mayor proporción) y su capacidad de retener agua (Chenu y Stotzky, 2002). Nuevamente Fisher y colaboradores (2007) señalan que hay una correlación entre la distribución de suelos arenosos finos y la distribución de *Coccidioides* spp. en los Estados Unidos.

Químicamente se ha asociado a *Coccidioides* spp. con suelos salinos, lo cual combinado con altas temperaturas inhibe el crecimiento de bacterias y promueve el crecimiento de *Coccidioides* (Egeberg *et al.* 1964; Elconin *et al.* 1964). El boro ha sido asociado con la presencia de *Coccidioides* en suelos endémicos sin embargo en estudios realizados por Lacy y Swatek (1974) y por Fisher y colaboradores (2007) no encuentran estas características universalmente en las muestras de otro sitios, dónde se ha comprobado la presencia de *Coccidioides*, atribuyendo estos hallazgos a que la mayoría de las bacterias no pueden crecer en esas condiciones salinas o de pH alcalino eliminando así competencia para el hongo.

Se sabe mucho sobre algunos de los requerimientos físicos para el crecimiento y dispersión de *Coccidioides*, pero no se conoce mucho sobre la relación de este hongo con otros organismos.

2.1.2. Relaciones bióticas

Coccidioides spp. es capaz de infectar a cualquier mamífero (Emmons 1942). Se han reportado casos en diversos animales domésticos y se apuntaba a diversos posibles reservorios animales y vegetales del hongo. Debido a que la distribución de *Coccidioides* es amplia y se ha encontrado en zonas con tipos de vegetación variables, se descartó la asociación de *Coccidioides* con especies vegetales. No obstante, en la mayor parte de las zonas muestreadas se observó la presencia de roedores y en 1942 se realizó el primer estudio prospectivo de roedores como posibles reservorios de la enfermedad. En este trabajo se muestrearon 5 especies de roedores, y se buscaron signos de infección y se buscó aislar al hongo de tejidos. Sólo en dos de las especies se logró aislar el hongo: en *Dipodomys merriami* y *Perognathus baileyi*; sin embargo, sólo en el último se observaron lesiones y sólo se aislaron cultivos de 17% de los especímenes de *D. merriami* y 15% de *P. baileyi* (Emmons, 1942). Este trabajo concuerda con la previa asociación de la gobernadora ya que los montículos de arena que se forman debajo de la planta son comúnmente utilizados por los roedores. En diversos estudios se señaló la presencia de estos roedores del Género *Dipodomys* en áreas donde existen reportes de aislamientos de *Coccidioides* y al parecer han sido el único elemento biótico compartido por la mayoría de las regiones endémicas donde se ha encontrado a *Coccidioides* (Swatek, 1970). Recientemente en Sudamérica se han identificado a los armadillos de la especie *Dasypus novemcinctus* como

portadores del hongo y se han utilizado muestras aisladas de tejido homogenizado de armadillo como inóculo para infectar ratones (Kelsen *et al.* 2001; de Macedo *et al.* 2011) y en Estados Unidos Barker y colaboradores (2012) lograron identificar molecularmente distintas cepas de *Coccidioides* en muestras de suelo tomadas de suelo superficial y madrigueras de roedores en los alrededores de Tucson, Arizona. Sin embargo, desde 1942 la relación de los roedores con *Coccidioides* no ha sido abordada en especial en las diversas zonas endémicas en que se ha identificado. El estudio de esta relación puede acercarnos al entendimiento del nicho ecológico de *Coccidioides* en su medio, desde el punto de vista de las relaciones bióticas que éste pueda tener con otros organismos que ocupen el mismo hábitat.

2.2 Área de estudio

Se seleccionó el área de estudio debido a reportes previos de 21 casos de coccidioidomicosis diagnosticados en un grupo de 126 miembros de una iglesia estadounidense que construía un orfanato en un predio que se encuentra dentro del Valle de Las Palmas (VDP), Baja California, México (Cairns *et al.* 1999). Además estudios realizados por nuestro grupo han confirmado molecularmente la presencia de *Coccidioides* spp. en VDP (Baptista-Rosas *et al.* 2012).

VDP está ubicado dentro del municipio de Tecate, Baja California (32°24'35" N y 116°40'45" O) a 28 Km de la ciudad de Tecate. Se caracteriza

por ser una región de transición entre matorral costero y chaparral, con especies características de comunidades vegetales xerófilas. Estas regiones se encuentran entre las regiones xéricas más altas del estado (1000 a 1300 msnm) con temperatura anual mínima de 4 °C y máximas de 35 °C (Programa Estatal de Acción Ante el Cambio Climático de Baja California, 2011). Se registran precipitaciones anuales de 209 mm con un marcado periodo de sequía en verano (PEACC, Baja California, 2011). En su mayor parte el tipo de suelo es rendzina caracterizado por una composición alta de grava y rocas (Delgadillo, 1995). El tipo de vegetación presente en el área de estudio es chaparral desértico, el cual se caracteriza por tener sistemas radicales extensos y contener especies pirófilas. Por ser vegetación de transición se caracteriza por tener especies de matorral costero y chaparral de montaña (**Figura 4**). Las comunidades vegetativas suelen ser abiertas y dominadas por arbustos, sin embargo se pueden encontrar especies arbóreas nativas como mezquites (*Prosopis glandulosa*) e introducidas como el eucalipto (*Eucalyptus sp.*). Entre las especies más representativas se encuentran *Simmondsia chinensis*, *Ephedra californica*, *Adenostoma fasciculatum*, *Yucca schidigera*, *Ferocactus acanthodes*, *Mammillaria dioica*, *Artemisia californica*, y *Salvia apiana*, entre otras (Delgadillo, 1992).



Figura 4. Panorámica de la zona de muestreo en Valle de Las Palmas. Se encuentra en una región rodeada de casas y ranchos habitados todo el año (Junio de 2010).

2.3 Aspectos clínicos y diagnóstico

La coccidioidomicosis ataca a pacientes de cualquier edad, sin embargo los casos más severos se presentan en infantes y adultos de edad avanzada. La enfermedad se presenta en mayor proporción en pacientes del sexo masculino. La etnia también juega un papel importante, siendo más vulnerables personas de origen filipino o africano. Las mujeres que se encuentren en la segunda mitad de su embarazo también presentan un alto riesgo de contraer la enfermedad; y por último se encuentran aquellas personas que sufren de inmunosupresión por cáncer, quimioterapias, uso de esteroides, enfermedades autoinmunes, enfermedades debilitantes del sistema inmune, entre otros (Einstein y Royce, 1993).

Como se mencionó anteriormente el desarrollo de la coccidioidomicosis depende principalmente del sistema inmune del hospedero y de la cantidad de inóculo. El 60% de los casos son asintomáticos, el 40% restante presentan síntomas, comúnmente parecidos a los de una gripe o neumonía común por lo que son generalmente mal diagnosticados. Se cree que en las regiones endémicas un porcentaje elevado de pacientes con neumonía (29% para el estado de Arizona, Estados Unidos) sufren el padecimiento como consecuencia de la coccidioidomicosis (Valdivia *et al.* 2006). Los síntomas de la enfermedad normalmente ocurren de 7 a 21 días después de la inhalación de los artroconidios. Los principales síntomas son tos, fiebre, diaforesis nocturna, escalofríos, disnea, artralgia, mialgia, pérdida de peso y en casos severos erupciones cutáneas. Del 10% al 50% presentan eritema nodoso y 25%

presentan síntomas iguales a los de una pulmonía común lo que lleva a tratamientos antibacterianos errados. Se ha encontrado que sólo en 1-5% de los casos la coccidioidomicosis se disemina, ocurriendo meses o años después de manifestarse la enfermedad. Se cree que la diseminación depende del tipo de sangre (ABO) y del antígeno leucocitario clase II. La diseminación se puede dar a cualquier órgano o tejido a través de la linfa y la corriente sanguínea, sin embargo, los nódulos linfáticos, piel y huesos son los más afectados. Las meninges son raramente afectadas, pero de serlo es el caso más severo de la enfermedad y termina en la muerte del paciente de no darse un tratamiento oportuno (Saboulle *et al.* 2010).

La forma más simple de diagnosticar la coccidioidomicosis es a través de observación directa de estructuras celulares del hongo mediante microscopía. Sin embargo distinguir al hongo de otros hongos saprobios y patógenos puede ser difícil, además de necesitar personal altamente capacitado para la búsqueda e identificación de endoesporas e hifas en biopsias de tejido (siendo necesaria la presencia de endoesporas para poder identificar al hongo correctamente). Una de las técnicas más útiles para la observación de muestras provenientes de cultivos son la fijación con hidróxido de potasio (KOH) y la tinción con calcoflúor blanco (CW), la cual es especialmente útil para la detección de hongos ya que el CW se adhiere a la quitina. En el caso de muestras histológicas, la tinción Gomori-Grocott de metamina y plata para hongos es la más sensible (Einstein y Royce, 1993). El diagnóstico microscópico puede ser confirmado inoculando animales con diluciones de

artroconidios y esperando al desarrollo del cuadro clínico (Einstein y Royce, 1993; Sabouille *et al.* 2007). No obstante en los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares de diagnóstico donde se utilizan secuencias específicas del hongo para comprobar su presencia en muestras de tejido, suero, cultivos o de ADN genómico extraído de suelo (Johnson *et al.* 2004; Umeyama *et al.* 2006; Binnicker *et al.* 2007; Vucicevic *et al.* 2010; Baptista-Rosas *et al.* 2012; Barker *et al.* 2012).

El suero sanguíneo es comúnmente utilizado para la detección de la fase de infección del hongo, comúnmente asociada con la presencia de inmunoglobulina M (IgM), presente en la fase aguda temprana y la inmunoglobulina G (IgG), la cual se queda circulando en el cuerpo tiempo después de pasada la fase aguda o clínica de la enfermedad. Esta característica de la inmunoglobulina permite que sean utilizadas como herramientas para el diagnóstico de la coccidioidomicosis en personas con un cuadro clínico similar al de la coccidioidomicosis, así como en personas de las cuales se sospecha una exposición previa o posible recaída (Pappagianis y Zimmer, 1990). Las inmunoglobulinas pueden ser detectadas mediante varias pruebas, sin embargo, las pruebas más comúnmente utilizadas en la actualidad son la inmunodifusión de precipitación en tubo (IDTP) y la aglutinación con látex (LA) para la IgM y la inmunodifusión de fijación del complemento (IDCF) para la IgG. El principio de estas pruebas tiene que ver con el título del anticuerpo presente en solución en el fluido y la concentración del antígeno, los cuales al encontrarse en una matriz porosa como la agarosa forman un precipitado que

se torna visible comprobando así la presencia de suficiente anticuerpo como para declarar la prueba positiva (Pappagianis y Zimmer, 1990). El desarrollo de las herramientas moleculares y la secuenciación del genoma de *Coccidioides* han ayudado a desarrollar oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias y poder detectar al hongo molecularmente tanto en muestras clínicas como ambientales.

3. JUSTIFICACIÓN

El nicho ecológico que una especie ocupa está determinado por los requerimientos nutrimentales y físicos necesarios para su desarrollo. Existen dos tipos de nicho, el que el organismo ocupa y para cual está más adaptado, llamado nicho realizado y el nicho el cual podría ocupar si no tuviera competencia, el cual se llama fundamental (Hutchinson, 1957). La competencia intraespecífica e interespecífica por ocupar estos nichos es una fuerza evolutiva importante y por lo tanto el conocimiento de los nichos que ocupa y puede ocupar una especie dentro de un ecosistema nos podría dar información de donde se encuentra, como se alimenta, de que se alimenta y con quien compete; así mismo nos puede dar información de como cambiaría su desarrollo y comportamiento ante cualquiera de la variables presentes en su nicho, lo cual es especialmente importante en el caso de patógenos ambientales. Se ha demostrado como se mencionó en los antecedentes que el estudio ecológico de los patógenos oportunistas y ambientales nos puede dar información acerca de sus mecanismos de infección, dispersión y desarrollo (Nielsen *et al.* 2007; Meentemeyer *et al.* 2008). Existen diversos estudios que han identificado a los roedores como reservorios, portadores y vectores de patógenos microbianos ambientales (Mills *et al.* 1997; Durnez *et al.* 2010). En el caso de *Coccidioides* parte de su nicho ha sido estudiado pero las relaciones bióticas dentro de este nicho son desconocidas (Swatek, 1970; Baptista-Rosas *et al.* 2007) y el estudio de estas relaciones podrían ayudar a delimitar mejor su

distribución espacial y temporal, lo cual ayudaría a entender mejor al patógeno y prevenir epidemias y el reciente incremento de infecciones por año.

4. HIPÓTESIS

- Se detectara un número significativo de roedores que han sido expuestos a especies de *Coccidioides* mediante inmunoensayos dirigidos a la detección de anticuerpos anti-*Coccidioides* en suero sanguíneo.
- Se obtendrán cultivos de *Coccidioides* spp. aislados de homogenizados de vísceras de roedores y muestras de suelo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la relación entre la comunidad de roedores y el hongo patógeno *Coccidioides* spp. en el Valle de Las Palmas, Tecate, Baja California, México.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener una muestra representativa de roedores del área de estudio.
2. Detectar la presencia de anticuerpos anti-*Coccidioides* en la sangre de los roedores.
3. Obtener cultivos fúngicos a partir de tejidos de los roedores capturados y de muestras de suelo del área.
4. Identificar molecularmente *Coccidioides* spp. a partir de cultivos de tejido de roedores y ADN total de suelo del área de estudio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestreo en campo

Se llevó a cabo un muestreo no aleatorio dirigido en zonas donde se detectó actividad de roedores, incluyendo senderos, letrinas y zonas con alimento disponible, ésto en un área circular de 314 Ha (con centro en las coordenadas descritas en el capítulo 2.2). Una vez seleccionados los puntos de muestreo se colocaron trampas tipo Sherman para la captura de roedores en espacios con vegetación abundante. Se utilizó avena humedecida con extracto de vainilla como atrayente para los roedores.

Se realizaron tres salidas de campo, una salida prospectiva el 11 de octubre de 2010, una el 11 de Diciembre de 2010 y una última el 10 de Mayo de 2011. Los sitios de muestreo se ubicaron dentro de un área circular con centro dentro del rancho Puerta de Gorriones, esta área abarcó aproximadamente 314 Ha (**Figura 5**). Dentro de esta circunferencia durante la primer salida se marcaron 4 zonas de muestreo que fueron seleccionadas por la evidencia de roedores en el área y la evidencia de zonas de vegetación poco impactadas capaces de sustentar una población de roedores; esto con el objetivo de identificar las áreas potenciales de extracción (**Figura 5**). En los subsecuentes muestreos se colocaron 24 estaciones de muestreo dentro de la zona de muestreo 3. Los roedores capturados se anestesiaron con pentobarbital sódico (120 a 210 mg/kg) y luego fueron fotografiados. Luego se les extrajo sangre

(entre 1-2 ml) mediante punción cardiaca y posteriormente fueron sacrificados y diseccionados para extraer los pulmones, los cuales fueron preservados en agua destilada, transportados en hielo al laboratorio y posteriormente congelados. La sangre obtenida fue puesta en hielo en una gradilla y se esperó a que ésta se coagulara para recuperar el suero. Una vez coagulada la sangre, el suero fue puesto en hielo y transportado al laboratorio donde fue congelado para su uso posterior.

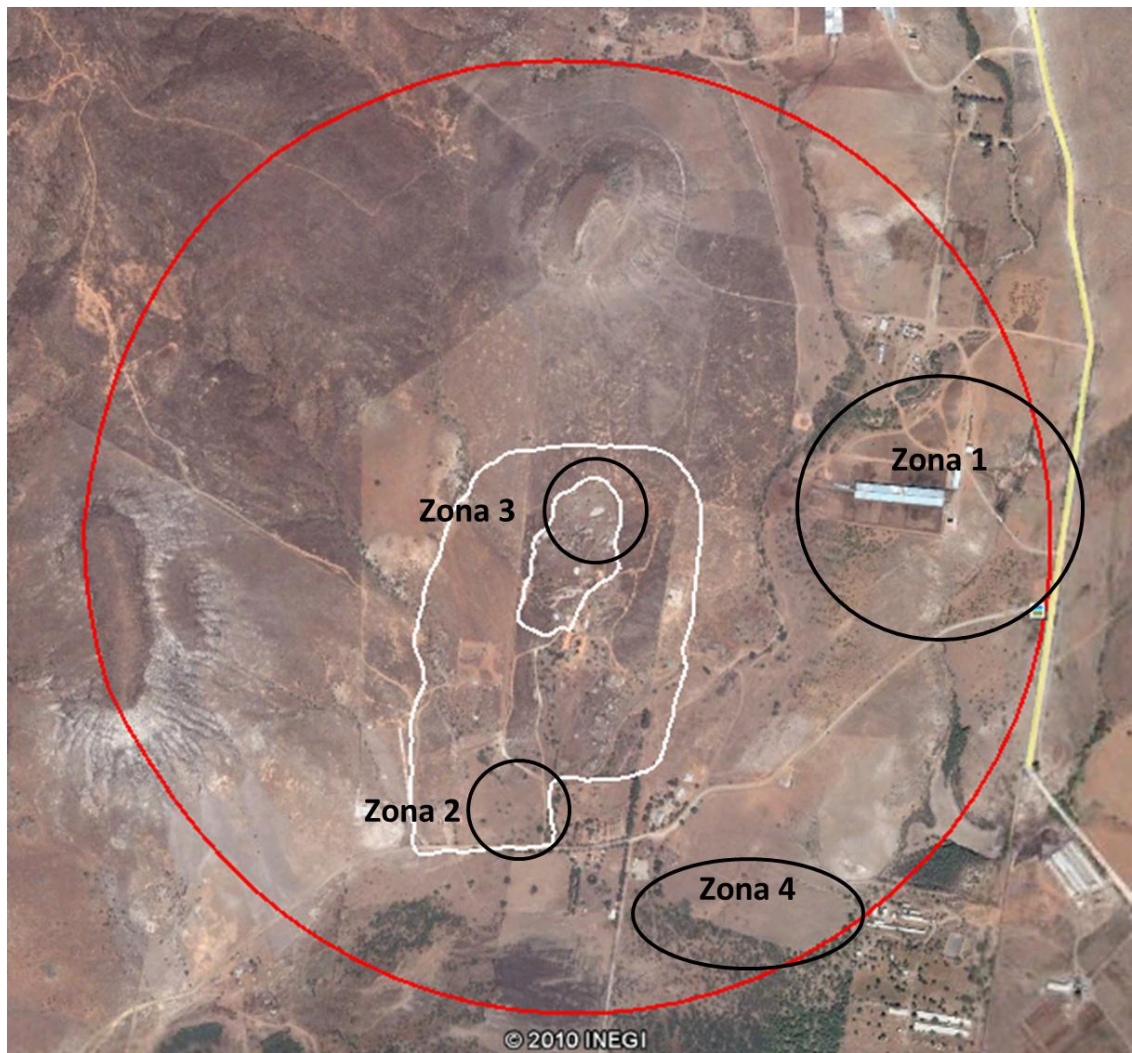


Figura 5. Área de muestreo considerada para la primer salida de campo (circulo rojo) de 314 Ha. El polígono delimitado en blanco corresponde al Rancho Puerta de Gorriones.

El muestreo se llevó a cabo bajo la licencia de colecta con número de oficio SGPA/DGV/S/01901/11/01901/11 autorizada por la Dirección de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) de México.

Para el análisis ecológico de la comunidad de roedores se calcularon el índice de Sorensen el cual estima el porcentaje de similitud de áreas de muestreo o muestras usando la diversidad y el índice de Morisita el cual estima la similitud tomando en cuenta la abundancia y la diversidad (Sorensen, 1957; Morisita, 1959). El índice de Sorensen se calcula con la siguiente fórmula:

$$(1) C_s = \frac{2c}{a+b} \times 100$$

Donde:

a = número de especies en la comunidad o muestra 1

b = número de especies en la comunidad o muestra 2

c = número de especies que se encontraron en ambas comunidades o muestras

El índice de Morisita se calcula con la siguiente fórmula:

$$(2) I_m = \frac{2 \sum X_i Y_i}{(\lambda_1 + \lambda_2)(N_1 N_2)}$$

Donde:

X_i = número de especies en la comunidad o muestra 1

Y_i = número de especies en la comunidad o muestra 2

N_1 = número de especies que se encontraron en la comunidad o muestra 1

N_2 = número de especies que se encontraron en la comunidad o muestra 1

λ_1 = índice de Simpson para la comunidad o muestra 1

λ_2 = índice de Simpson para la comunidad o muestra 2

por ultimo el índice de Simpson se calcula con la siguiente ecuación:

$$(3) \lambda = \frac{\sum [X_i(X_i-1)]}{N(N-1)}$$

Donde:

X_i = número de individuos de la especie i

N = número total de individuos de todas las especies muestreadas.

6.1.2 Muestras de suelo

En las 24 estaciones de muestreo de la última salida de campo, se tomó una muestra de suelo por estación. Las muestras se tomaron a 5-15 cm de profundidad. Para ello se utilizó una pala, la cual era limpiada con cloro al 20% para evitar contaminación cruzada y las muestras de suelo fueron tomadas con cucharas desechables limpias. La muestra fue colectada en vasos para muestras clínicas estériles (alrededor de 100 gr) los cuales fueron transportados al laboratorio en una hielera para la extracción de ADN genómico total y cultivos.

6.2 Ensayo de inmunodifusión

Para comprobar la exposición previa de los roedores a *Coccidioides* se utilizó el kit de IMMY Antibodies system (Norman, Oklahoma, EUA) para inmunodifusión de fijación del complemento (IDCF por sus inglés), siguiendo las instrucciones del fabricante se utilizaron aproximadamente 30 μ L de suero por pozo y se incubaron por 48 hrs. a temperatura ambiente en cajas Petri usadas como cámara húmeda.

6.3 Obtención de antígeno

El antígeno se obtuvo creciendo tres cepas de *Coccidioides* spp. obtenidas de muestras clínicas de pacientes que contrajeron la enfermedad en el estado de Baja California. Estas cepas fueron suministradas amablemente por el M.C. Jorge Luna Isaac de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Para la extracción del antígeno se modificó método de Galgiani y colaboradores (1988). Las cepas fueron inoculadas en medio GYE 2X líquido en matraces de 250 ml por duplicado y se dejaron crecer por 2 semanas a 28 °C. El micelio fue transferido a matraces con 50 ml de agua destilada estéril con 10 ml de tolueno y se dejaron en agitación a 28 °C hasta que el tolueno se evaporó completamente. Los restos de micelio se filtraron con una jeringa y filtros de 0.2 mm (Millipore, Massachusetts, EUA) para obtener el antígeno (filtrado) al cual se le agregó azida de sodio (0.05% v/v).

6.4 ELISA

La concentración de antígeno fue calculada mediante un ensayo de ácido bicinconínico de Pierce (BCA por sus siglas en inglés) siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA).

Los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) se realizaron en placas Immulon HB2 (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, EEUU). El antígeno se diluyó en 12 ml de solución de

cubrimiento de carbonatos. Se añadieron 100 µl de antígeno (Lisado de tolueno) diluido a cada pozo de la placa a una concentración de una concentración de 0.01562 µg/µL y se incubó en una cámara húmeda por 14 horas a 4 °C. Después de la incubación se hicieron 3 lavados con 200 µl de solución amortiguadores de fosfatos con tween 20 (PBST por sus siglas en inglés) en cada pozo y dejándolo reposar por tres minutos entre lavado, posteriormente se secó la placa golpeando la placa en contra de toallas de papel absorbente. El bloqueo de las placas se llevó a cabo vertiendo 200 µl de solución de bloqueo de PBST con suero normal de cabra (SNC) al 10% v/v en PBST en cada pozo y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Una vez bloqueada la placa se hicieron tres lavados y se añadieron 100 µl por pozo de solución de anticuerpo primario (suero de roedores silvestres) previamente diluidos en solución de bloqueo a una concentración de 1:50, 1:100 y 1:200 y se utilizó suero de ratón común (*Mus musculus*) adquiridos en una tienda veterinaria local donde los ratones nacen y crecen dentro de un bioterio cerrado como control negativo. Después se incubaron las placas a 37 °C por 1 hora. Una vez transcurrida la hora de incubación se lavó la placa 3 veces más con PBST y una vez seca se añadieron 100 µl por pozo de anticuerpo secundario de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, EUA) diluida 1:6000 y se incubó la placa 1 hora más a 37 °C para después lavar 3 veces con PBST. Una vez seca se agregaron 100 µl de Sistema líquido de sustrato TMB (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) a temperatura ambiente y se dejó incubar por 30 minutos en

oscuridad. Una vez pasados los 30 minutos se añadieron 100 µl de ácido sulfúrico 1N y se leyó la placa a 450 nm en un lector de ELISA (Biorad Benchmark®, Hercules, California, EUA).

6.5 Cultivos

Los pulmones extraídos de los organismos fueron troceados con navajas estériles y se colocaron en cajas Petri conteniendo medio Sabouraud líquido con cicloheximida y cloranfenicol (0.5 mg/ml y 0.05 mg/ml, respectivamente) para inhibir el crecimiento de bacterias y otros hongos presentes.

Para el crecimiento de *Coccidioides* de las muestras de tierra se siguió un protocolo sugerido en comunicación personal con la Dra. Suzanne M. Johnson del Departamento de Microbiología Médica e Inmunología de la Universidad de California en Davis. Para el aislamiento de *Coccidioides* a partir de muestras de suelo se tomaron 5 gramos de suelo de la muestra, los cuales fueron diluidos en 45 ml de solución salina estéril en tubos de ensayo de poliestireno de 50 ml; éstos fueron agitados enérgicamente y se dejaron reposar por 1 hora para esperar que se asentara toda la materia pesada de la muestra. El sobrenadante fue después transferido a otro tubo estéril nuevo para ser centrifugado a 2,000 g por 30 minutos y el pellet se utilizó para inocular matraces con 50 ml de medio Sabouraud líquido con ciclohexamida y cloranfenicol a las concentraciones antes mencionadas. Los matraces se dejaron toda la noche en incubación a 37 °C sin agitación para promover la

germinación de los artroconidios y fueron mantenidos en agitación a 37 °C por 1 semana. Después de una semana de crecimiento, se usó el micelio obtenido con características macroscópicas aparentemente de *Coccidioides* para inocular nuevo medio de cultivo y poder observar mejor el crecimiento de las colonias que tenían características similares a *Coccidioides*. Las colonias resultantes fueron fijadas y revisadas al microscopio para confirmar la presencia de *Coccidioides*. Las laminillas para el microscopio fueron preparadas con el método de aplastamiento (squash) tomando una pequeña muestra del micelio la cual se coloca en un portaobjetos al cual se le agrega una pequeña gota de azul de algodón. Una vez aplastado y esparcido el micelio sobre el portaobjetos usando el cubreobjetos éste es fijado con esmalte para uñas, asegurándose de que el material no pueda escapar del portaobjetos.

6.6 Extracción de ADN

Los micelios de los cultivos aislados potencialmente correspondientes a *Coccidioides* se inactivaron por dos procedimientos: la primera mitad en autoclave a 100 °C por 20 minutos y la otra mitad fueron inactivadas colocando los micelios en matraces estériles de 250 ml con 50 ml de alcohol etílico al 70% v/v toda la noche. Las colonias inactivadas se dejaron con medio de cultivo en incubación por una semana a 28 °C para comprobar su inactivación. Se recuperaron los micelios en papel filtro Whatman® estéril de 125 mm de diámetro haciendo vacío. Una vez recolectado el micelio se secó a presión con otro papel filtro estéril y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

El micelio inactivado por calor se enrolló y se colocó en un tubo de polipropileno de 45 ml al que se le perforó la tapa y se sumergió en nitrógeno líquido por 45 segundos. La muestra se liofilizó 24 horas a -40°C a una presión de 0.02 mbar. El liofilizado fue molido con pistilo y mortero. El pulverizado se colectó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Las muestras inactivadas con alcohol fueron lavadas por triplicado con agua destilada estéril antes de la extracción de ADN. Las extracciones de ADN se realizaron con el kit de extracción ZR Fungal/Bacterial DNA kit® (Zymo Research, Irvine, California, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección molecular de *Coccidioides* en las muestras de suelo se extrajo ADN genómico total. Esto se logró utilizando el kit de extracción de ADN de suelo UltraClean soil DNA isolation kit (Mobio Laboratories Inc. Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.7 Identificación molecular

6.7.1 ADN genómico total de suelo

Una vez extraído el ADN total de las muestras de suelo se comprobó molecularmente si ADN de *Coccidioides* estaba presente en la muestra mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada diseñada por nuestro grupo de trabajo (Baptista-Rosas *et al.* 2012) la cual utiliza en su primera y segunda reacción oligonucleótidos que amplifican la región ITS (ITS1-5.8s-ITS2) de hongos Dikarya, seguida de una PCR utilizando oligonucleótidos

específicos para *Coccidioides* descritos por Martin y Rygiewics (2005) y por Binnicker y colaboradores (2007), respectivamente. Para la primera PCR se utilizan los oligonucleótidos NSA3 sentido (5' – AA ACTCTGTCGTGCTGGGGATA - 3') y NLC2 antisentido (5'- GAGCTGCATTCCCAAACA ACTC - 3') y una segunda PCR utilizando el producto de la primera PCR como ADN templado. Para la segunda PCR del los ITS fúngicos se utilizaron los oligonucleótidos NSI1 sentido (5'– GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3') y NLB4 antisentido (5'- GGATTCTCACCTCTATGAC-3'). En la tercera PCR se utilizan los oligonucleótidos ITS2F sentido (5'- CGAGGTCAAACCGGATA-3') y ITS2R antisentido (5'- CCTTCAAGCACGGCTT-3'). Para la primera y segunda PCR se utiliza de 15 a 20 ng de ADN (genómico para la primera PCR y aproximadamente 1 µM de la primera PCR para la segunda). Para cada reacción se utilizaron 205 mM de MgCl₂, 0.6 µM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de cada dNTP, solución amortiguadora GoTaq Flexi polymerase a una concentración de 1x y 1U de GoTaq Flexi polymerase (Promega) Las muestras fueron procesadas en un termociclador MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler (Bio Rad) bajo un programa con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por un 35 ciclos de un primer paso de desnaturalización de 95°C por 40 segundos, un segundo paso alineamiento de 60°C a 30 segundos y un último paso de extensión de 72°C por 2 minutos, seguidos de una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para la amplificación de la región ITS específica de *Coccidioides* se utilizó 1 µL de una dilución 1/100

del amplicón de la segunda PCR de 900 pb. El programa en el termociclador será: una desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos seguido de 45 ciclos de un primer paso de 95°C por 10 segundos, un Segundo paso de 59°C por 15 segundos y un último paso de 20 segundos a 72°C, seguido de la extensión final de 10 minutos a 72°C. Se espera un amplicón de aproximadamente 172 pb. Se corrieron 5 µL de la 3era PCR en un gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio y se observaron las bandas amplificadas con luz UV.

6.7.2 ADN de colonias aisladas

Una vez extraído el ADN de las colonias, se comprobó molecularmente si las colonias encontradas eran *Coccidioides* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la cual se utilizaron los oligonucleótidos ITS2 diseñados por Binnicker y colaboradores (2007) para amplificar un fragmento de 172 pb de la región ITS2 de *Coccidioides*. Para la PCR se utilizaron de 15 a 20 ng de ADN, los cuales se añadieron a un mezcla de PCR conteniendo 2.0 mM de MgCl₂, 10 µM de cada oligonucleótido, 2.5 mM de dNTPs y 0.04 U de polimerasa GoTaq Flexi (Promega) y fue llevado a 50 µL con agua destilada estéril. Las muestras se procesaron en un termociclador Multigene II (Labnet International Inc.) bajo un programa con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por un 35 ciclos de un primer paso de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, un segundo paso alineamiento de 65°C a 30 segundos y un último paso de extensión de 72°C por 1 minuto, seguidos de una extensión final de 72°C por 5 minutos. Se

corrieron 5 μ L en un gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio y se observaron las bandas amplificadas con luz UV.

6.7.3 Secuenciación

Los amplicones correspondientes al fragmento de 170 pb del tercer paso de la PCR anidada fueron secuenciados para afirmar si se trataba de *Coccidioides*. Las reacciones positivas fueron corridas en un gel de agarosa al 2% a 60 V. Las bandas fueron cortadas del gel y purificadas con el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit® (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, el ADN se envió a secuenciar a la compañía SeqXcel Inc. (San Diego, California, EUA). Los archivos de secuenciación fueron revisados y editados con el programa FinchTV (Geospiza, Seattle, Washington, EUA) y las secuencias fueron alineadas mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local (BLAST por sus siglas en inglés) disponible en el sitio de herramientas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés).

6.8 Procedimientos de Bioseguridad

Todos los protocolos que involucraron la exposición potencial o directa con cultivos de *Coccidioides* fueron realizados en un gabinete de bioseguridad nivel 3 (BSL-3 por sus siglas en inglés) ubicado en la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California, el cual está diseñado siguiendo los lineamientos de instalaciones recomendados por los Centros para

la Prevención y Control de las Enfermedades de EUA (CDC por sus siglas en inglés). Se siguieron las prácticas microbiológicas generales descritas para BSL-3 de acuerdo a lo estipulado por la CDC, usando el equipo de protección recomendado por los mismos, el cual consta de batas desechables de cuerpo completo con aseguramiento trasero, lentes de seguridad, cubre bocas con filtro N95, red de cirugía para cabello y uso de dos pares de guantes de látex. Todo el equipo de protección fue esterilizado por autoclave antes de ser desechado en depósitos de desecho de material biológico infecciosos.

7. RESULTADOS

7.1 Muestreo en campo

Los muestreos se realizaron durante los meses de Octubre de 2011, Diciembre de 2011 y Mayo de 2012. Las condiciones climáticas en el VDP tuvieron comportamientos similares durante los diferentes años de muestreo con la mayor parte de la precipitación presentándose durante los meses de invierno y las temperaturas más altas registrándose en los meses de Julio, Agosto y Setiembre, justo antes del inicio de la temporada de lluvias (**Figura 6**). El VDP tiene asentamientos humanos y una población aproximada de 1,926 habitantes. El uso principal de la tierra es agrícola (INEGI, 2012); sin embargo, se observaron granjas avícolas y algunos ranchos ganaderos en los predios que rodean a la zona de muestreo. Dentro de la zona de muestreo se encuentra una granja lechera (Zona 1 en la salida 1), zonas agrícolas abandonadas (Zona 2 y 4) y una zona con vegetación natural (Zona 3) de la que se extrajeron las muestras para los experimentos.

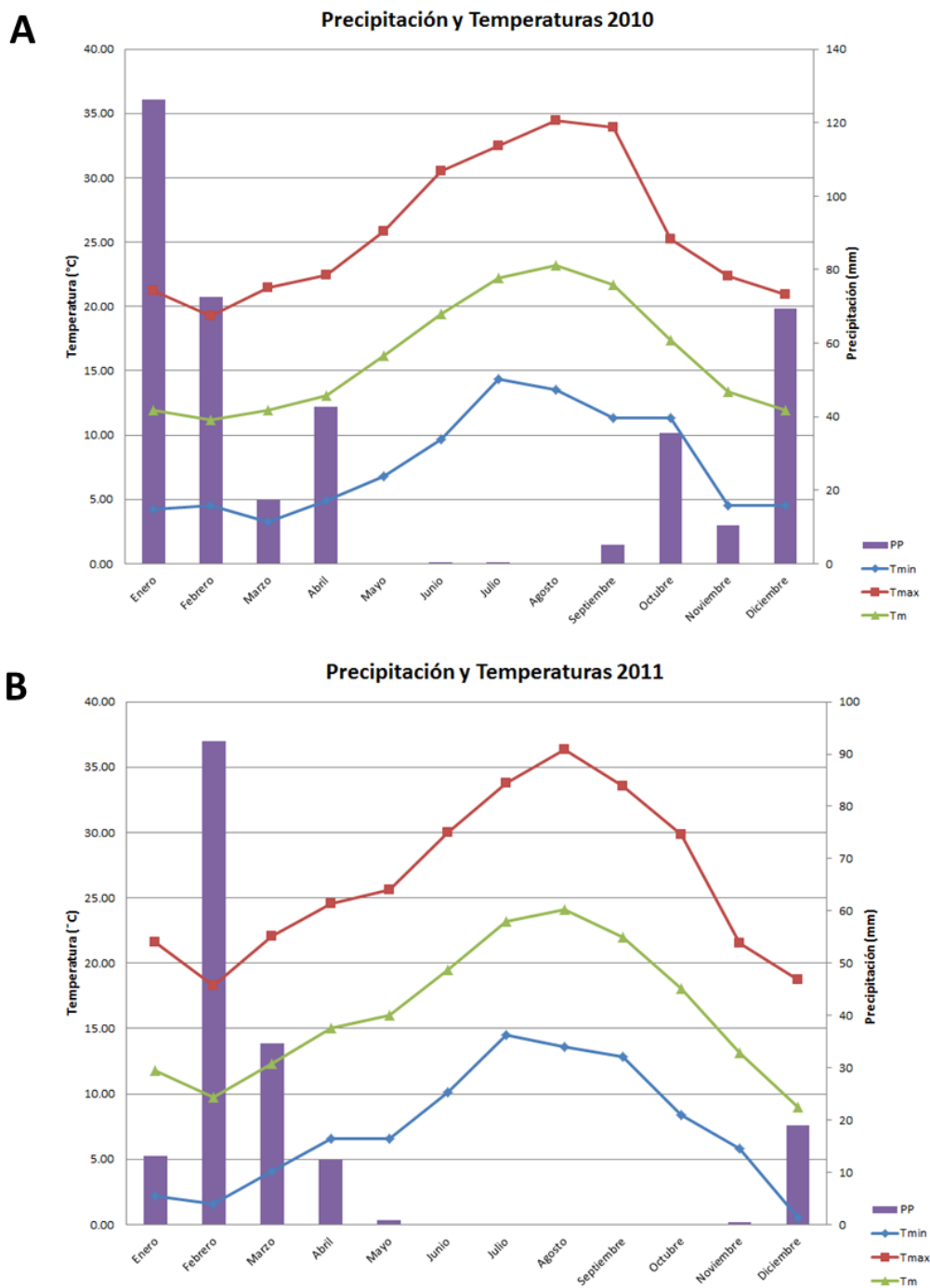


Figura 6. Temperaturas máximas, mínimas y medias mensuales, así como la precipitación total mensual para Valle de las Palmas, Baja California, México. Datos tomados del Sistema de Información para el Manejo de Agua de Riego en Baja California (SIMARBC)¹.

¹ <http://www.sefoa.gob.mx/simarbc/> consultado el 20 de Abril de 2012

En la **Figura 7** se observa la frecuencia total de especies de roedores capturadas por zona. Un total de 80 roedores fueron trampeados en las 3 salidas. Los índices de Sorensen y Morisita fueron calculados para todas las zonas de muestreo (**Tabla I**). El índice de Sorensen toma en cuenta la diversidad y es un porcentual; donde 100 indica que no hay diferencia entre las zonas o muestreos analizados; por otra parte, el índice de Morisita toma en cuenta la diversidad y la abundancia de cada especie muestreada y un valor cercano a 1 indica similitud total entre los sitios o muestreos comparados. De estos valores, se puede observar que la Zona 3 es la menos similar a las otras zonas muestreadas y que no hubo mucha diferencia entre los tres muestreos realizados en la Zona 3 en cuanto a diversidad, lo que concuerda con los datos de clima ya que no hubo diferencia significativa en la cantidad de agua disponible y por lo tanto podríamos asumir que la disponibilidad de alimento no varió mucho entre muestreo y no se puede considerar como una variable influyente en la abundancia de las especies encontradas.

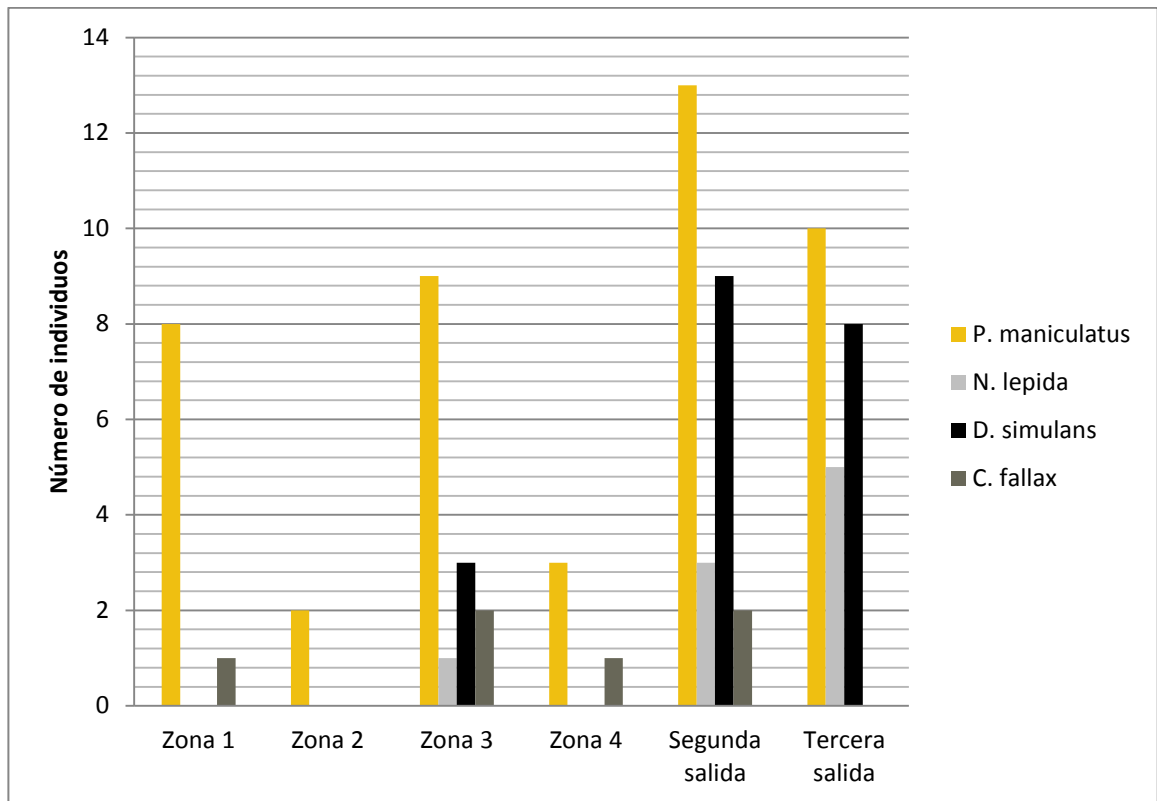


Figura 7. Abundancia y diversidad para cada zona de muestreo por salida de campo. La **segunda y tercera** salida de campo solo se llevo a cabo en la Zona 3.

Tabla I. Índices de Sorensen y Morisita para cada zona. En las salidas 2 y 3 solo se muestreo la Zona 3

		Salida 1				Salida 2	Salida 3
	Indice	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4		
Salida 1	Zona 1	Sorensen	---	80.000	66.667	66.667	80.000
		Morisita	---	0.5	0.349	0.543	0.391
	Zona 2	Sorensen	---	---	40.000	66.667	40.000
		Morisita	---	---	0.434	0.5	0.360
	Zona 3	Sorensen	---	---	---	66.667	100.000
		Morisita	---	---	---	0.548	0.519
	Zona 4	Sorensen	---	---	---	---	66.667
		Morisita	---	---	---	---	0.454
	Salida 2	Sorensen	---	---	---	---	85.714
		Morisita	---	---	---	---	0.526
Salida 3	Salida 3	Sorensen	---	---	---	---	---
		Morisita	---	---	---	---	---

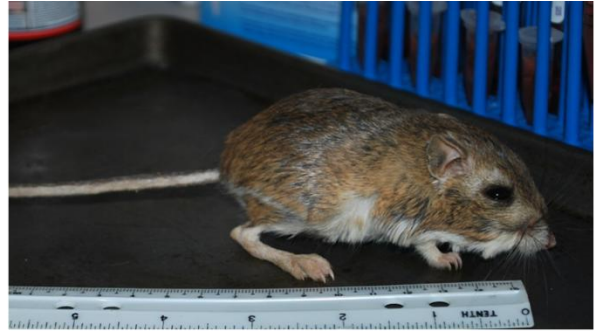
De las 80 muestras 40 ejemplares fueron liberados por ser demasiado pequeños para obtener una cantidad suficiente de suero para los inmunoensayos y ser difíciles de manipular en el campo (la mayor parte de ellos fueron *P. maniculatus*). De ésta manera se obtuvieron y posteriormente se sacrificaron, 10 roedores en el muestreo del 11-10-2010, 15 en el muestro del 11-12-2010, y 15 en el muestreo del 10-05-2011. Los roedores capturados correspondieron a las especies *Peromyscus maniculatus* (conocida como ratón ciervo), *Neotoma lepida*. (rata montera), *Dipodomys simulans*. (rata canguro), y *Chaetodipus fallax* (ratón de bolsillo de San Diego) (Reid, 2006) (**Figura 8**). La frecuencia de captura de las especies identificadas se puede observar en la **Tabla II**. La especie mas frecuente fue *D. simulans* (45% de los roedores capturados), seguida por *P. maniculatus* con 27.5%, *N. lepida* con 20% y *C. fallax* con 7.5%. Una gran cantidad de madrigueras con características similares a las construidas por *D. simulans* se encontraban en el sitio, éstas se caracterizan por ser comúnmente construidas en la base de arbustos medianos en la arena o suelo fino que se acumula bajo ellas con el viento (Reid, 2006).

Tabla II. Especies capturadas en y sus frecuencias relativas.

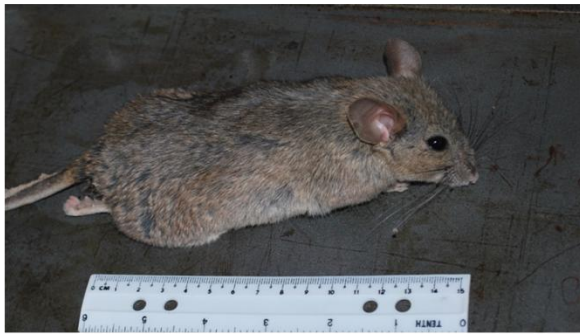
Fecha	Especies	Frecuencia
11/10/2010	<i>Peromyscus maniculatus</i>	4
	<i>Chaetodipus fallax</i>	2
	<i>Dipodomys simulans</i>	4
11/12/2010	<i>Peromyscus maniculatus</i>	4
	<i>Chaetodipus fallax</i>	1
	<i>Dipodomys simulans</i>	7
	<i>Neotoma lepida</i>	3
10/05/2011	<i>Peromyscus maniculatus</i>	3
	<i>Dipodomys simulans</i>	7
	<i>Neotoma lepida</i>	5



Peromyscus maniculatus
Ratón ciervo



Dipodomys simulans
Rata canguro



Neotoma lepida
Rata montera



Chaetodipus fallax
San Diego Pocket Mouse

Figura 8. Especies de roedores capturados en VDP durante las tres salidas de campo.

7.2 Aislamiento de colonias e identificación molecular

7.2.1 Aislamiento de colonias a partir de pulmones

En ninguna de las muestras de pulmones se observó crecimiento dos semanas después de ser inoculadas e incubadas a 28 °C (**Figura 9**). Se detuvo el procesamiento debido a que se encontró en la literatura que tanto el micelio como las artrosporas no pueden sobrevivir aun congelamiento lento a temperaturas <-20 °C sin algún protector como la glucosa (Converse *et al.* 1959).

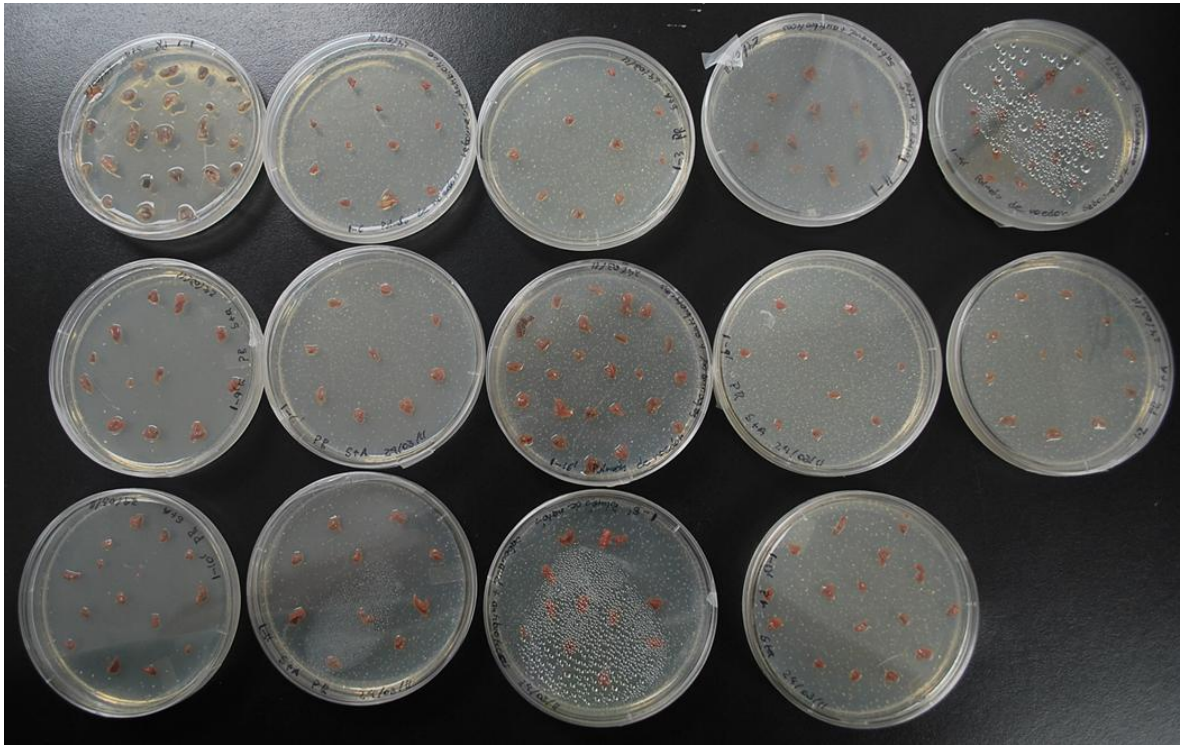


Figura 9. Pulmones troceados y usados como inóculo en medio Sabouraud (Cloranfenicol y Ciclohexamida) después de dos semanas de incubación.

7.2.2 Muestras de ADN genómico total de suelo

De las 24 muestras de suelo, se extrajo ADN genómico total, 15 resultaron positivas para la PCR de diagnóstico de *Coccidioides* (**Figura 10**). Los amplicones del tamaño esperado (172 pb) fueron secuenciados. La secuenciación confirmó que 11 de las 15 muestras corresponden a la parte de la región ITS de *Coccidioides* spp. mientras que otras tres amplificaron secuencias ITS que se alinearon con secuencias pertenecientes a hongos Ascomicetos del género *Aphanoascus* (siendo *A. candensis* y *A. pinarensis* los hits de puntaje más alto en el BLAST), y la muestra restante amplificó parte de la secuencia ITS de *Penicillium*. En la **Figura 11** se muestra el alineamiento obtenido entre los fragmentos amplificados, contra los ITS de *Coccidioides* depositados en NCBI.

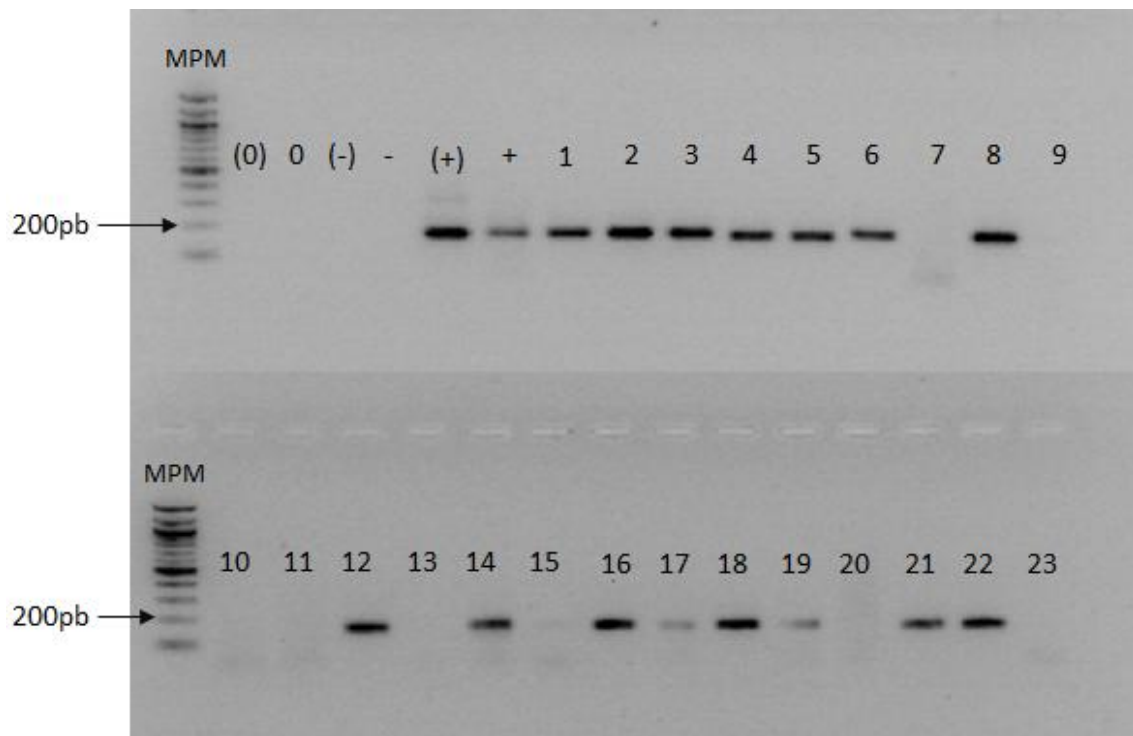


Figura 10. Gel de agarosa (2%) donde se muestran las reacciones de la tercera PCR anidada de las muestras de ADN genómico total extraído del suelo. Donde **MPM** es el marcador de peso molecular, los **0** corresponden a los blancos, los signos - corresponden a los controles negativos y los signos + corresponden a los controles positivos, los signos entre **()** indica que dichos controles han sido acarreados desde la primera reacción. Los números indican la estación de donde fue tomada la muestra, la muestra 24 no se muestra pero fue negativa.

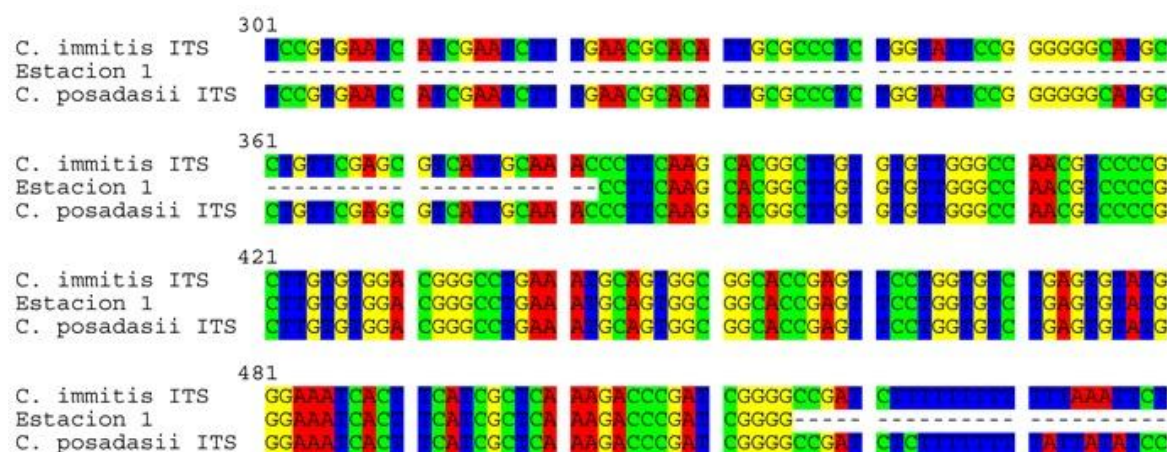


Figura 11. Ejemplo de alineamiento resultante del BLAST. Las líneas designadas como *C. immitis* y *C. posadasii* ITS corresponden a las secuencias parciales de la región ITS 1 y 2 de esas especies con números de acceso NCU EF186789.1 y EF186786.1 respectivamente; la línea designada como **Estación 1** corresponde a la muestra del carril 1 en la **Figura 10**, tomada en la estación de muestreo 1 (**Tabla III**).

7.2.3 Muestras de ADN genómico de colonias aisladas

Utilizando las mismas muestras de suelo se lograron aislar 12 colonias con características coloniales similares a las reportadas para *Coccidioides*, las cuales incluyen colonias esféricas (si éstas son crecidas en agitación). Si se dejan sin perturbación éstas desarrollan micelios de apariencia húmeda, glabros y de color blanquecino que pueden tornarse grises o marrones con el tiempo (Emmons, 1942; **Figura 12 A y B**). El ADN genómico pudo ser extraído de 8 muestras y éste se sometió a la tercera PCR del método utilizado para las muestras de ADN de suelo. Seis de las muestras amplificaron fragmentos de 170 pb (**Figura 12 C**), y de éstas la muestra 16 y la muestra 11-2 fueron confirmadas como *Coccidioides* por secuenciación y alineamiento por BLAST. La **Tabla III** resume los resultados encontrados para cada estación de muestreo.

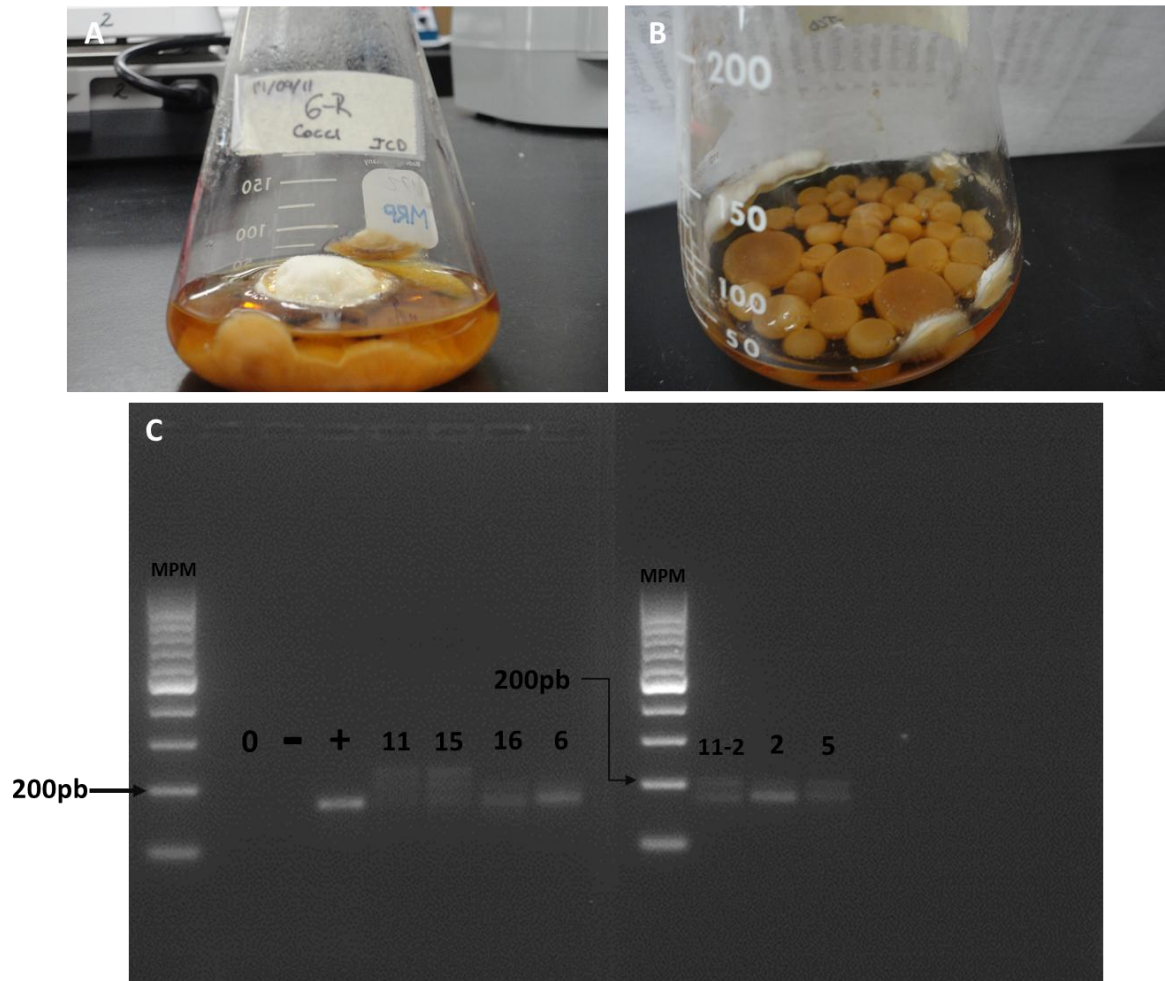


Figura 12. Morfología de las colonias y resultado de la PCR diagnóstica de *Coccidioides*. **A)** Morfología del aislado 6 correspondiente a *Aspergillus alliaceus*. Nótese que se observa una morfología similar a la descrita para *Coccidioides*. **B)** Morfología del aislado 11-2 correspondiente a *Coccidioides* spp. **C)** Gel de agarosa (2%) mostrando los amplicones obtenidos de la extracción de ADN de las colonias aisladas de las muestras de suelo. Donde **MPM** corresponde al marcador de peso molecular, **0** corresponde al blanco, el signo **-** corresponde al control negativo y el signo **+** corresponde al control positivo. Las muestras **11** y **11-2** corresponden a dos colonias diferentes aisladas de la misma muestra de suelo.

Tabla III. Estaciones de muestreo, localización geográfica y resultados obtenidos para cada estación.

Estación	Coordenadas	ADN genómico total de suelo	ADN Colonia
1	N 32° 24' 49.8" - W 116° 40' 45.5"	<i>Coccidioides spp.</i>	
2	N 32° 24' 49.7" - W 116° 40' 45.8"	<i>Coccidioides spp.</i>	<i>Aspergillus alliaceus</i>
3	N 32° 24' 50.0" - W 116° 40' 45.6"	<i>Aphanoascus canadensis/ A. pinarensis</i>	
4	N 32° 24' 50.3" - W 116° 40' 45.7"	<i>Coccidioides spp.</i>	
5	N 32° 24' 50.9" - W 116° 40' 45.8"	<i>Aphanoascus canadensis/ A. pinarensis</i>	<i>Escherichia coli</i>
6	N 32° 24' 50.5" - W 116° 40' 45.3"	<i>Coccidioides spp.</i>	<i>Aspergillus alliaceus</i>
7	N 32° 24' 51.1" - W 116° 40' 45.4"		
8	N 32° 24' 51.3" - W 116° 40' 45.8"	<i>Coccidioides spp.</i>	
9	N 32° 24' 51.7" - W 116° 40' 45.4"		
10	N 32° 24' 51.9" - W 116° 40' 45.7"		
11	N 32° 24' 52.3" - W 116° 40' 45.2"		<i>Aspergillus alliaceus/Coccidioides (11-2)</i>
12	N 32° 24' 52.3" - W 116° 40' 45.7"	<i>Coccidioides spp.</i>	
13	N 32° 24' 53.6" - W 116° 40' 44.9"		
14	N 32° 24' 53.1" - W 116° 40' 45.5"	<i>Penicillium sp.</i>	
15	N 32° 24' 53.1" - W 116° 40' 44.0"		<i>Aspergillus alliaceus</i>
16	N 32° 24' 53.2" - W 116° 40' 44.0"	<i>Coccidioides spp.</i>	<i>Coccidioides spp.</i>
17	N 32° 24' 53.0" - W 116° 40' 44.0"	<i>Aphanoascus canadensis/ A. pinarensis</i>	
18	N 32° 24' 52.9" - W 116° 40' 43.9"	<i>Coccidioides spp.</i>	
19	N 32° 24' 52.8" - W 116° 40' 43.5"	<i>Coccidioides spp.</i>	
20	N 32° 24' 53.0" - W 116° 40' 43.0"		
21	N 32° 24' 52.0" - W 116° 40' 43.5"	<i>Coccidioides spp.</i>	
22	N 32° 24' 51.9" - W 116° 40' 44.1"	<i>Coccidioides spp.</i>	
23	N 32° 24' 51.8" - W 116° 40' 44.3"		
24	N 32° 24' 51.5" - W 116° 40' 44.6"		

7.3 Inmunoensayos

7.3.1 Inmunodifusión

Las 40 muestras de suero fueron sometidas a una prueba de inmunodifusión (IDCF por sus siglas en inglés) para detectar IgG o IgM en la muestras; sin embargo, en ninguna de las muestras se encontró la presencia de anticuerpos **(Figura 13)**.

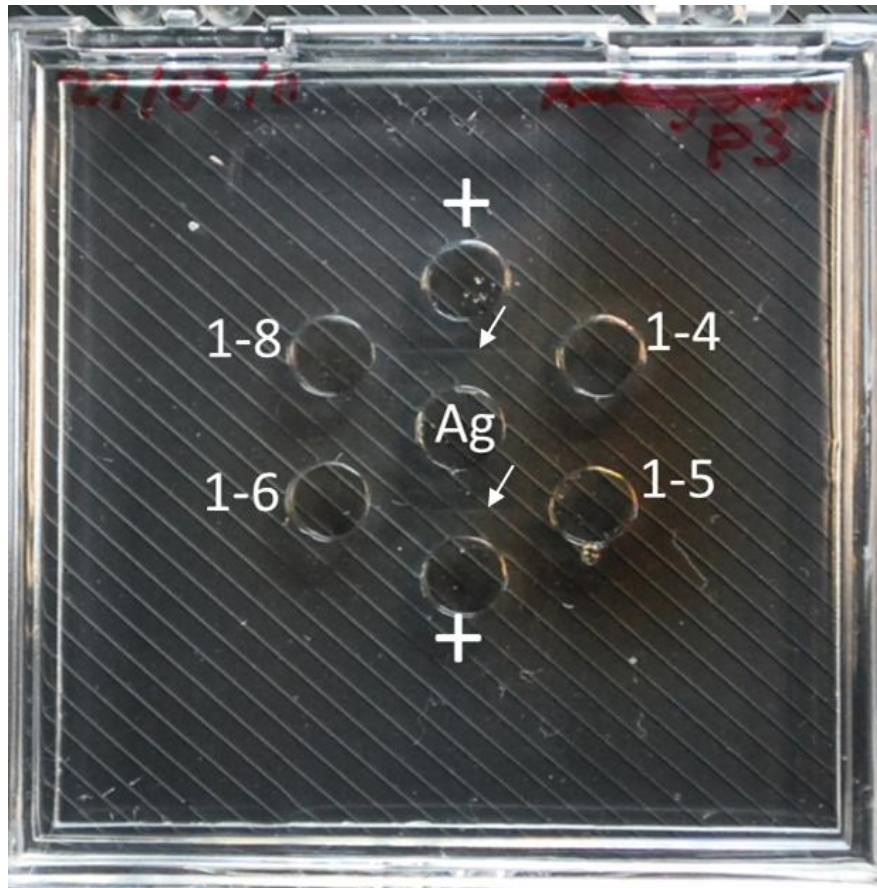


Figura 13. Ejemplo de placa de IDCF los signos + representan los controles positivos (suero positivo), las marcas **1-4**, **1-5**, **1-6** y **1-8** corresponden a muestras de suero de roedores capturados en la zona de muestreo 1. Las flechas blancas indican la posición de la banda del control positivo

7.3.2 ELISA

Las 40 muestras fueron probadas por ELISA para determinar la presencia de anticuerpo IgG anti-*Coccidioides* en las muestras de suero. Las muestras fueron divididas en 2 sets de experimentos *i. e.* se hicieron 2 ensayos, cada uno de ellos con 3 placas procesadas simultáneamente bajo las mismas condiciones. Se hicieron 3 diluciones del anticuerpo primario (el suero de los roedores) y se dividieron las placas de tal manera que cada dilución tuviera 4 lecturas para cada dilución. Las 4 lecturas se promediaron tanto para las muestras como para los controles negativos. Se observó que la mejor dilución de anticuerpo primario fue la más concentrada, la dilución 1:50 por dar una lectura de absorbancia mas alta. En la **Figura 14** se muestran las lecturas corregidas (absorbancia promedio de la muestra menos la absorbancia promedio del control negativo) de las muestras cuya absorbancia promedio en la dilución 1:50 fue ≥ 0 , si el valor de absorbancia corregido resultaba en un valor negativo este fue tomado como 0. Se observa que las muestras 2, 4, 5 y 8 son positivas para el primer ensayo que corresponden a dos *P. maniculatus* y dos *Neotoma* sp.; los cuatro especímenes fueron capturados durante la segunda salida de campo fechada 11 de Diciembre del 2011. Para el segundo ensayo ninguna de las muestras fue positiva por obtener menor absorbancia corregida que el negativo.

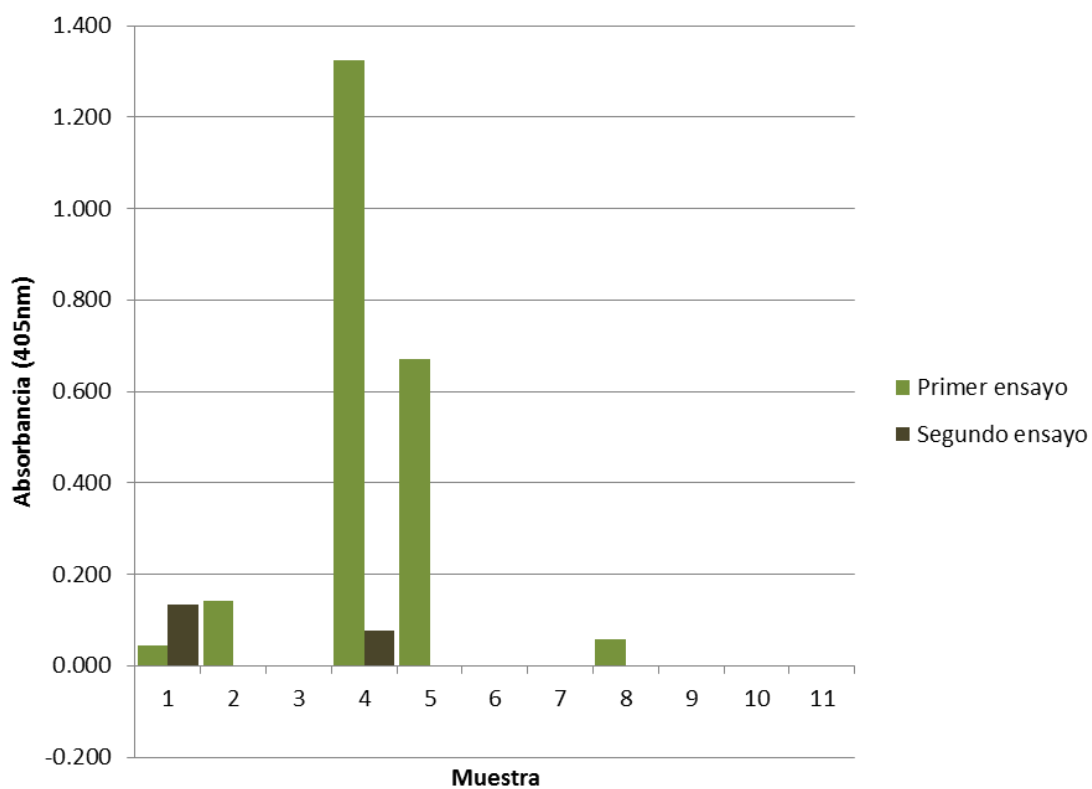


Figura 14. Gráfica de absorbancias corregidas. En la **Tabla IV** se indica el número de muestra, la absorbancia y la especie asociada a cada muestra. La absorbancia promedio de los negativos fue graficada como referencia para cada ensayo.

Tabla IV. Muestras graficadas en la **Figura 14.**

Primer ensayo			
Número	ABS 1:50 ^a	ABS corregida ^b	Especie
1*	0.045	0.000	<i>Mus musculus</i>
2	0.188	0.143	<i>Peromyscus maniculatus</i>
3	0.045	0.000	<i>Neotoma lepida</i>
4	1.370	1.325	<i>Peromyscus maniculatus</i>
5	0.716	0.671	<i>Neotoma simulans</i>
6	0.025	0.000	<i>Dipodomys simulans</i>
7	0.044	0.000	<i>Dipodomys simulans</i>
8	0.103	0.058	<i>Neotoma lepida</i>
Segundo ensayo			
Número	ABS 1:50	ABS corregida	Especie
1*	0.135	0.000	<i>Mus musculus</i>
2	0.005	0.000	<i>Peromyscus maniculatus</i>
3	0.004	0.000	<i>Peromyscus maniculatus</i>
4	0.213	0.213	<i>Dipodomys simulans</i>
5	0.007	0.000	<i>Neotoma lepida</i>
6	0.024	0.000	<i>Neotoma lepida</i>
7	0.025	0.000	<i>Peromyscus maniculatus</i>
8	0.012	0.000	<i>Dipodomys simulans</i>
9	0.045	0.000	<i>Dipodomys simulans</i>
10	0.012	0.000	<i>Neotoma lepida</i>
11	0.008	0.000	<i>Dipodomys simulans</i>

* Control negativo

^a Absorbancia promedio de las 4 replicas ensayadas^b Absorbancia promedio de muestra menos absorbancia del control negativo

8. DISCUSIONES

Las condiciones climáticas que se presentaron durante las salidas de campo fueron muy similares en cuanto a temperatura y precipitación mensual e incluso los datos obtenidos durante los meses de muestreo son congruentes con los patrones mensuales de años anteriores (SIMARBC, 2012). Esto nos indica que por lo menos dos factores importantes que son la temperatura y la precipitación presentaron patrones favorables para el desarrollo de *Coccidioides*; esto es periodos de abundancia de agua, seguidos de periodos secos con temperaturas relativamente altas (Talamantes *et al.* 2007). La dirección del viento es oeste noroeste con una velocidad promedio de 1.82 m/s (SIMARBC 2012); es importante destacar que el oeste y noroeste del área de muestreo se encuentra rodeada por cerros formando un pequeño valle en el área de muestreo; estos cerros pueden estar funcionando como trampas de aire que atrapan el polvo proveniente de otras áreas y distribuyendo el material atrapado por los escurrimientos de agua que van hacia el Valle. Cabe señalar también que de las zonas de muestreo seleccionadas la Zona 3 es la zona con menos perturbación antropogénica y fue también el lugar donde se capturaron la mayor cantidad de individuos de cada una de las especies capturadas durante la primera salida de campo además de ser el único sitio donde se encontraron roedores seropositivos para *Coccidioides*. El único rasgo particular de este sitio es la presencia de una comunidad vegetal que se observa sana debido a que las tierras no están habitadas y no están siendo utilizadas para ninguna

actividad humana. A pesar de esto no se deben descartar los sitios con impactos severos como lo fueron las Zonas 1, 2 y 4, debido a que éstas se muestrearon una sola vez y no sabemos si la comunidad de roedores que los habitan cambian significativamente y por lo tanto si esto tiene una influencia directa sobre la presencia de roedores seropositivos. Se capturaron 4 especies de roedores en estas zonas de muestreo, característicos de regiones áridas y semi áridas, condiciones climáticas del VDP. Así mismo cuatro muestras de suero de roedores (dos *P. maniculatus* y dos *N. lepida*) presentaron reacción contra el antígeno extraído de *Coccidioides*. En cuanto a la identificación molecular, de las 24 muestras de suelo tomadas, 15 fueron positivas para *Coccidioides* utilizando PCR anidada para amplificar la región ITS2 de *Coccidioides*, sin embargo, tres muestras amplificaron la región ITS2 de hongos del género *Aphanoascus* y una muestra más amplificó la secuencia ITS2 de *Penicillium*. Las muestras de suelo también se utilizaron para aislar cultivos a partir de inóculos de suelo en medio Sabouraud, de los cuales se obtuvieron 2 cultivos identificados molecularmente como *Coccidioides*.

Los estudios ecológicos sobre *Coccidioides* se encuentran entre los primeros trabajos de campo reportados. Parte de estos trabajos se dedicaron a buscar alguna relación entre los organismos que comparten hábitat con el hongo (Swatek, 1970). Sin embargo, debido a la dificultad para aislar el organismo del suelo los trabajos sobre las relaciones bióticas del hongo han sido muy escasos. En 1942 Emmons y Ashburn aislaron por primera vez

Coccidioides de roedores y encontraron que de 303 roedores, 16 estaban infectados, pudiendo aislar al hongo de pulmones y posteriormente identificarlo por microscopía. Cuatro especies de roedores fueron capturadas, entre ellas *Dipodomys merriami* y *Peromyscus eremicus*. Se encontró que el 17% de los individuos de *D. merriami* se encontraban infectados por el hongo, mientras que ninguno de los *P. eremicus* se encontraron infectados. Emmons fue el primero en sugerir la potencial importancia de los roedores como reservorios de la enfermedad e hipotetizó que la coccidioidomicosis era una enfermedad de roedores y que los suelos se tornaban infectivos al ser contaminados por roedores que transportan las esporas de zonas de crecimiento a otras zonas (Emmons, 1943). Sin embargo, otros autores y el mismo Emmons se retractaron argumentando que el único factor en común entre los sitios donde personas fueron infectadas eran el suelo o polvo de lugares endémicos (Ajello, 1967). Desde entonces el potencial de los roedores como posibles reservorios primarios no ha sido abordado. Si bien es posible que las principales fuentes de alimento del hongo en su fase saprobia se encuentren en el suelo donde crece como micelio, se ha demostrado que los suelos con alto contenido de carbono y materia orgánica dentro de las zonas endémicas ha sido donde se ha logrado aislar al hongo (Lacy y Swatek, 1974). Los roedores muestreados utilizan madrigueras más o menos profundas, en especial los roedores del género *Dipodomys*, que construyen madrigueras profundas y complejas donde almacenan gran cantidad de semillas y ramas como alimento, los cuales pueden ser fuentes de materia orgánica, protegidos del calor y con una

humedad mayor a la del ambiente (Reynolds, 1958). Estas madrigueras podrían funcionar como incubadoras naturales de *Coccidioides* y el hongo podría ser transportado en el pelaje o por un organismo infectado si llega a morir en otra área fuera de su madriguera, esto es aún discutido (Barker *et al.* 2012) y no se sabe a ciencia cierta cual es el papel de los roedores o si estos desempeñan algún papel en la distribución de *Coccidioides*. Este estudio y estudios anteriores (Baptista-Rosas *et al.* 2012) indican que la comunidad de roedores en Valle de las Palmas está expuesto a *Coccidioides*; esto fue comprobado al detectar ADN de *Coccidioides* en muestras de ADN total extraídas de suelo y quedó comprobado con el aislamiento de *Coccidioides* de dos muestras de suelo. Sin embargo, se esperaba que el número de organismos positivos detectados por ELISA fuera mayor dado que todos están en contacto directo con el suelo, el cual es el único reservorio identificado como tal por la literatura (Ajello, 1967; Swatek, 1970; Fisher, *et al.* 2000). A pesar de que los heterómidos construyen redes de túneles bastante complejas, lo que indica que estos organismos pasan una gran cantidad de tiempo en contacto con el suelo, (Hanney, 1975) anticuerpos anti-*Coccidioides* no pudieron ser detectados en ninguna de las muestras tomadas de estos organismos. Mientras que 2 muestras de *P. maniculatus*, un organismo que puede construir madrigueras en cualquier espacio recluso, incluyendo madrigueras abandonadas; y 2 muestras de *N. lepida* que construye madrigueras en la base arbustos espinosos y cactáceas (Hanney, 1975) fueron positivas, esto sugiere que estos organismos podrían estar presentando una respuesta inmune mas elevada ante la

presencia del patógeno o que simplemente los heterómidos no están reaccionando ante al anticuerpo secundario utilizado que fue anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante; sin embargo, se ha demostrado que las secuencias responsables de la estructura cuaternaria de los anticuerpos están conservadas en los mamíferos y la similitud es mayor dependiendo de la cercanía filogenética que presenten los organismos (Schroeder, *et al.* 1990). Se ha demostrado que los anticuerpos en ratón (*M. musculus*) y en rata negra común (*Rattus rattus*) están conservados, incluso a nivel de secuencia nucleotídica (Brüggeman *et al.* 1986). La **Figura 15** muestra la filogenia de las diversas familias de roedores. *P. maniculatus* y *N. lepida* pertenecen a la Familia *Cricetidae*, la cual es más cercana filogenéticamente a la Familia *Muridae* (ratones y ratas) y se encuentra en el mismo subclado, mientras que la familia *Heteromyidae* es la más distante dentro del clado de los roedores relacionados con ratones (Blanga-Kanfi *et al.* 2009). En estudios similares en búsqueda del virus Sin Nombre (VSN) en roedores se utilizó una mezcla de anticuerpos secundarios anti-*Rattus norvegicus* y anti-*Peromyscus leucopus* y ninguno de los heterómidos muestreados fue positivos para VSN (Mills, *et al.* 1997; Kuenzi, *et al.* 1999). Esto sugiere que los anticuerpos de múridos pueden no estar detectando los anticuerpos primarios de heterómidos y es necesario probar con anticuerpos específicos para heterómidos.

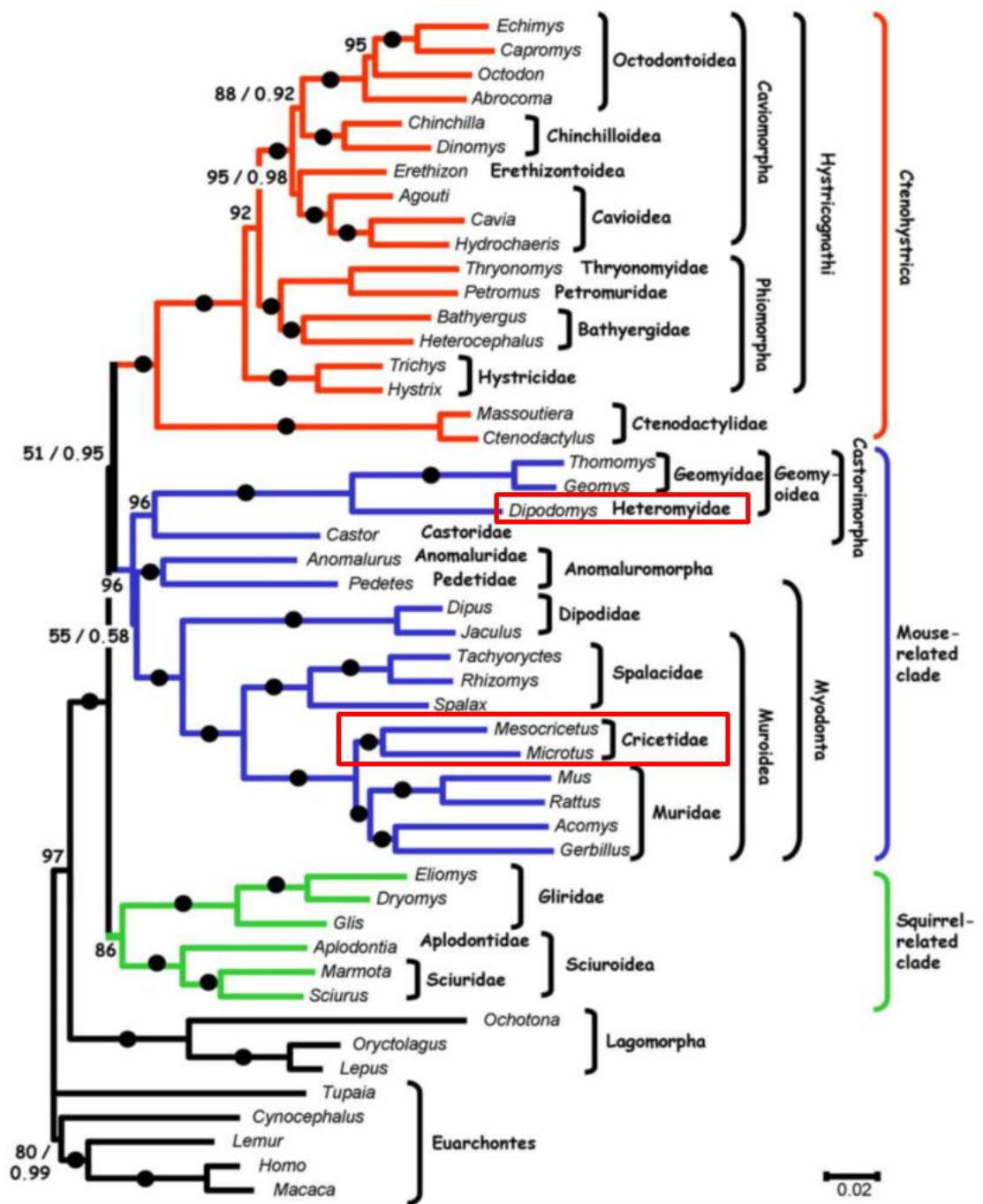


Figura 15. Árbol filogenético de máxima similitud construido utilizando 6 genes nucleares. Los recuadros rojos indican los clados donde se encuentran los roedores muestreados en este trabajo, *P. maniculatus* y *N. lepida* son miembros de la Familia Muridae al igual que el ratón común y la rata (*Mus* y *Rattus*), mientras que *D. simulans* y *C. fallax* son de la Familia Heteromyidae. Modificado de Blanga-Kanfi *et al.* 2009.

En cuanto a la identificación molecular, diversos grupos de trabajo han desarrollado protocolos para la detección molecular de *Coccidioides* (Greene *et al.* 2000; Umeyama *et al.* 2006; Binnicker *et al.* 2007; Luna-Isaac *et al.* 2010; de Macedo *et al.* 2011; Baptista-Rosas *et al.* 2012; Barker *et al.* 2012). Sin embargo, solo un par de ellos están enfocados a la detección molecular de *Coccidioides* en muestras ambientales y todos con diferentes grados de éxito. Nuestro grupo de trabajo desarrolló una PCR anidada capaz de detectar la presencia de *Coccidioides* en muestras de ADN total extraídos de suelo. A la par de nuestro trabajo otros protocolos están utilizando otros sets de oligonucleótidos que también se localizan en la región de ADN ribosomal en el genoma de *Coccidioides*; de estos trabajos sólo uno realizado en Brasil reporta 100% (n=24) de detección en muestras de suelo por PCR anidada, mientras que en otro reporte llevado a cabo en Tucson, Arizona, el 15% de muestras de suelo (n=106) fueron positivas y encontraron que de las 16 muestras de suelo positivas, sólo 11 lograron infectar ratones de laboratorio, mostrando así discordancia entre las muestras de suelo positivas detectadas por PCR anidada y los suelos que resultaron infectivos; por otra parte en nuestro trabajo previo se reportó que la mayor parte de las muestras que se positivas correspondían a muestras de suelo obtenidas de madrigueras de heterómidos; no obstante, los oligos utilizados detectaron falsos positivos correspondientes a hongos emparentados con *Coccidioides* que sólo pudieron diferenciarse por secuenciación (de Macedo *et al.* 2011; Baptista-Rosas *et al.* 2012; Barker *et al.* 2012). En este trabajo el 64.5% (n=24) de las muestras fueron positivas y todas

fueron tomadas del suelo superficial que se encontraba inmediatamente adyacente a las estaciones de muestreo, las cuales eran áreas de uso de los roedores y los 4 individuos que resultaron seropositivos para *Coccidioides* fueron capturados en estaciones que resultaron positivas en la PCR anidada. Esta relación puede ser totalmente coincidente ya que es probable que estos roedores estuvieran en los límites de su rango hogareño y no vivan precisamente en las zonas adyacentes a las estaciones de muestreo; además, colonias de *Coccidioides* no fueron aisladas de los suelos muestreados en esas estaciones de muestreo. El aislamiento ambiental ha probado ser un desafío ya que *Coccidioides* es un mal competidor y en cultivo es excluido por el crecimiento de otros hongos saprobios presentes en el suelo más competitivos. Así, sólo se han logrado aislamientos que van del 0% al 15% de aislamientos totales y los aislamientos positivos han utilizado como medio selectivo a organismos como los roedores, filtrando así cualquier cepa de *Coccidioides* que sean menos virulentas (Ajello, 1957; Swatek, 1970; Greene *et al.* 2000; Barker *et al.* 2012). Con nuestro método de aislamiento, a pesar de que sólo pudo obtenerse ADN de 8 de los 16 aislados y que el ADN extraído estaba muy degradado debido al proceso de inactivación de los cultivos, se logró identificar dos aislados como *Coccidioides*, lo que corresponde al 8.3% de las 24 muestras; El uso de un protocolo que nos permitiera lisar el tejido sin tener que desactivarlo antes, mejoraría considerablemente la técnica para identificar molecularmente las colonias aisladas y permitiría hacer un mejor análisis de las cepas aisladas; esto no pudo lograrse en el trabajo debido a restricciones en las

instalaciones utilizadas, ya que éstas no cuentan con el equipo necesario dentro del gabinete para realizar una extracción de ADN a partir de colonias vivas. Es muy probable que un mayor número de cepas se puedan aislar de las muestras de suelo tomadas, ya que sólo se inocularon 5 gr de suelo por muestra y si se hicieran repeticiones de las mismas podría incrementar el número de cepas ambientales aisladas.

Para la detección molecular directamente de muestras de suelo o de los cultivos aislados de las muestras de suelo, se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Binnicker y colaboradores (2007), los cuales se creía eran específicos para *Coccidioides*. Esto quedó refutado con nuestro trabajo previo (Baptista-Rosas *et al.* 2012) y confirmado en este estudio, dónde obtuvimos una vez más secuencias de *Aphanoascus*, *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo *Aphanoascus* el hongo más cercano filogenéticamente a *Coccidioides* (Sigler *et al.* 1998). En la **Figura 16** se puede observar el alineamiento de las regiones ITS de: los hongos detectados en este estudio, del hongo *Malbranchea* (el cual es comúnmente confundido con *Coccidioides* por microscopía y es anamorfo de *Uncinocarpus*), las dos especies conocidas de *Coccidioides* y una de las muestras positivas obtenidas para la estación de muestreo 1. Se puede observar en el alineamiento que la región amplificada por la PCR anidada está flanqueada por secuencias que están conservadas o tienen pocas diferencias, lo que permite que se puedan pegar los oligonucleótidos y amplificar secuencias que no corresponden a *Coccidioides*. La porción inicial de la región

ITS anotada en NCBI parece ser la más adecuada para la detección de *Coccidioides* ya que está conservada tanto en *C. posadasii* como en *C. immitis*, pero no en lo en los otros hongos. Es importante mencionar que la región ITS es una de las más usadas para el estudio taxonómico de los hongos a nivel de especie, por su grado de conservación en las regiones que flanquean a las regiones variables y el gran número de copias que permiten amplificarlo fácilmente; no obstante, se sabe que las secuencias dentro de estas regiones no son muy buenas para distinguir entre especies de hongos emparentadas (Peay *et al.* 2008).

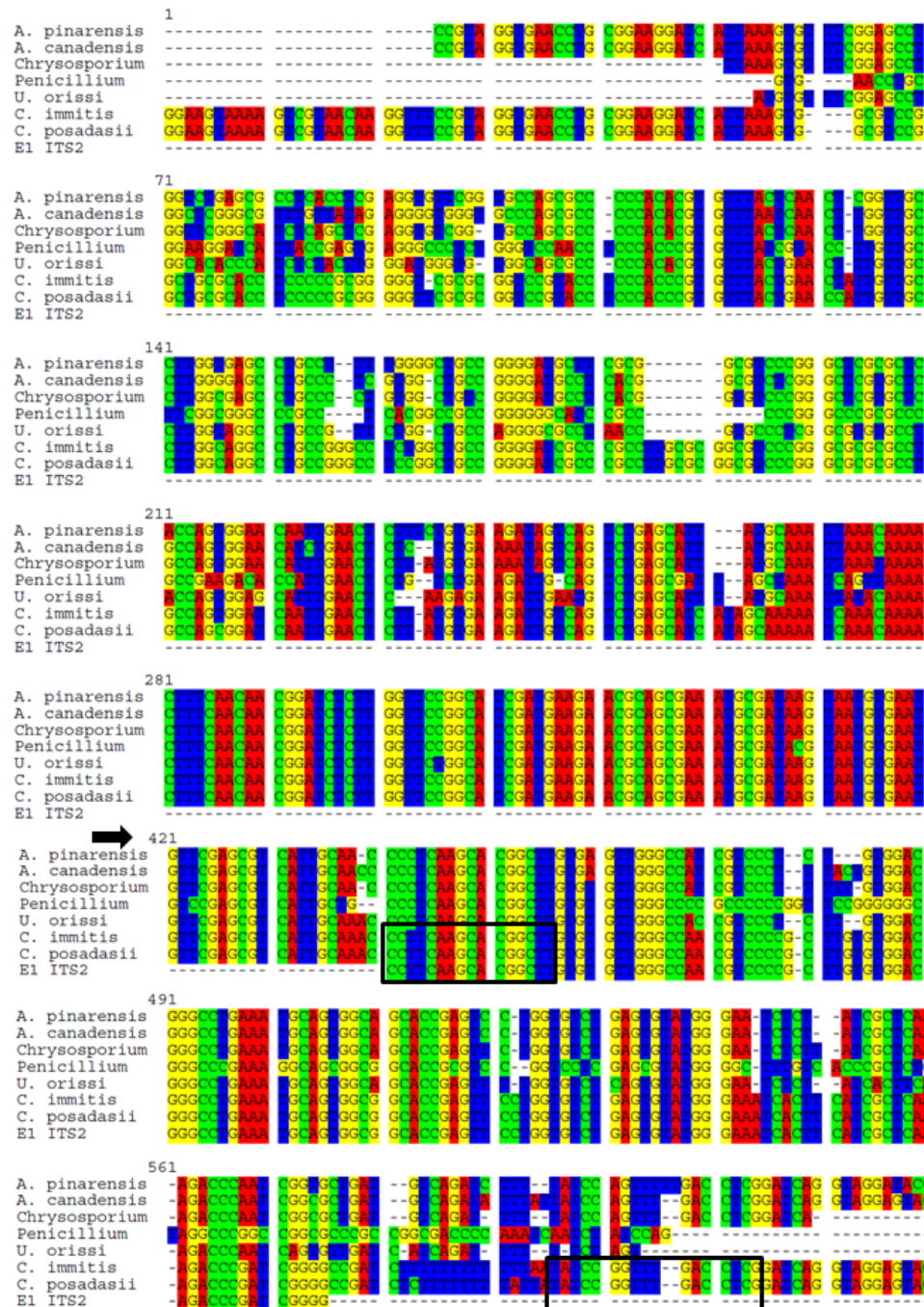


Figura 16. Alineamiento de las regiones parciales ITS de *A. canadensis* (AJ439435.1), *A. pinarensis* (AJ439433.1), *Chrysosporium* sp. (FJ430724.1), *U. orisii* (AJ390393.1), *Penicillium* sp. (GQ370373.1), *C. immitis* (EF186789.1), *C. posadasii* (EF186786.1) y el fragmento obtenido de la PCR anidada de la muestra de suelo tomada en la estación 1 de muestreo (**E1 ITS2**). La flecha indica un salto en la secuencia para mostrar los fragmentos amplificados por la PCR anidada y los recuadros negros indican la posición de los oligonucleótidos sentido y antisentido usados para la PCR diagnóstico.

9. CONCLUSIONES

1. Valle de las Palmas, en específico el área dentro del predio de muestreo es un sitio de crecimiento de *Coccidioides* y éste se puede desarrollar y sobrevivir en los suelos de estas áreas. Es necesario muestrear zonas con características diferentes como grado de impacto, vegetación secundaria y con diferentes actividades humanas para poder determinar si el Valle de las Palmas como región presenta características que permiten la presencia de *Coccidioides* en el suelo o es solo el área muestreada.
2. La PCR anidada es una herramienta robusta para la detección prospectiva de *Coccidioides* en el suelo siempre y cuando los oligonucleótidos utilizados sean específicos, sin embargo, para una detección segura es necesario combinar la PCR con otros métodos como aislamiento de colonias o usar ratones de laboratorio como medio de cultivo selectivo.
3. Es necesaria la búsqueda de secuencias fuera de la región ITS de *Coccidioides* ya que ésta es una región altamente conservada dentro del reino Fungi.
4. Los análisis de ELISAs demuestran que la comunidad de roedores en VDP está expuesta a *Coccidioides*, pero es necesario el desarrollo de anticuerpos específicos para algunas de las especies potenciales, para tener una mejor resolución en los experimentos y descartar cualquier falso negativo en los ensayos.

5. Es necesaria la experimentación directa con los roedores salvajes vivos para poder acreditar o descartar su rol en la distribución y desarrollo de *Coccidioides* en el medio ambiente.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ajello L. 1967. Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. *Bacteriological Reviews*. 31(1): 6-24
- Baptista-Rosas R.C., A. Hinojosa y M. Riquelme. 2007. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111: 1-12. DOI: 10.1196/annals.1406.003.
- Baptista-Rosas R.C., J. Catalán-Dibene, A.L. Romero-Olivares, A. Hinojosa, T. Cavazos y M. Riquelme. 2012. Molecular detection of *Coccidioides* spp. from environmental samples in Baja California: linking Valley Fever to soil and climate conditions. *Fungal Ecology*. 5(2): 177-190.
- Barker B.M., J.A. Tabor, L.F. Shubitz, R.P. Perril y M.J. Orbach. 2012. Detection and phylogenetic analysis of *Coccidioides posadasii* in Arizona samples. *Fungal Ecology*. 5(2): 163-176.
- Binnicker M.J., S.P. Buckwalter, J.J. Eisberner, R.A. Stewart, A.E. McCullough, S.L. Wohlfiel y N.L. Wengenack. 2007. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiolog.* 45(1): 173-178.

- Blanga-Kanfi S., H. Miranda, O. Penn, T. Pupko, R.W. DeBry y D. Huchon. 2009. Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evolutionary Biology*. 9: 71.
- Brüggermann M., J. Free, A. Diamond, J. Howard, S. Cobbold y H. Waldmann. 1986. Immunoglobulin heavy chain locus of the rat: Striking homology to mouse antibody genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83: 6075-6079.
- Cairns L., D. Blythe, A. Kao, D. Pappagianis, L. Kaufman, J. Kobayashi y R. Hajje. 1999. Outbreak of Coccidioidomycosis in Washington State Residents Returning From Mexico. *Infectious Disease*. 30: 60-64.
- Cameron R.E. 1966. Properties of desert soils. En: Pittendrigh C.S., W. Vishniac, y J.P.T Pearman. 1966. Biology and the Exploration of Mars. *National Academy of Science*. Washington D. C. EUA.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Increase in Coccidioidomycosis — California, 2000–2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 58 (5): 105-109.
- Chenu, C. y G. Stotzky. 2002. Interaction between microorganism and soil articles; an overview. En: Huang P.M., J.M. Bollag, y N. Senesi, (Eds.). *Interactions Between Microorganisms and Soil Particles*. John Wiley & Sons. Hoboken, N.J.

- Comrie A.C. 2005. Climate factors influencing Coccidioidomycosis seasonality and outbreaks. *Environmental Health Perspectives*. 113 (6): 688-692.
- Converse J.L, A.L Besener, L.C. Koneeny, H.F. Tantalo y E.M. Snyder. 1959. Stability of liquid cultures of *Coccidioides immitis* arthrospores to storage, drying, freezing and thawing. *US Army Chemical Corps Research and Development Command*. Pág. 2-3
- Delgadillo, J. 1992. Florística y ecología del norte de Baja California. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California, México.
- Egeberg R.O. y A.F. Ely. 1956. *Coccidioides immitis* in the soil of the Southern San Joaquin Valley. *American Journal of Medicine Science*. 231: 151-154.
- Egeberg R.O., A.E. Elconin y M.C Egeberg. 1964. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *Journal of Bacteriology*. 88: 473-476.
- Einstein H.E., y R.H. Johnson. 1993. Coccidioidomycosis: New aspects of epidemiology and therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 16 (3): 349-354.
- Elconin A.F., R.O. Egeberg. y M.C. Egeberg. 1964. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *Journal of Bacteriology*. 87: 500-503.
- Emmons C.W. 1942. Isolation of *Coccidioides* from soil and rodents. *Public Health Report*. 57:109-111.

- Emmons C.W. y L.L. Ashburn. 1942. The isolation of *Haplosporangium parvum* N. SP. and *Coccidioides immitis* from wild rodents. Their relationships with coccidioidomycosis. *Public Health Reports*. 57(46): 1715-1727.
- Emmons C.W. 1943. Coccidioidomycosis in wild rodents. A method for determining the extent of endemic areas. *Public Health Reports*. 58(47):1-5.
- Fisher F.S., M.W. Bultman, S.M. Johnson, D. Pappagianis y E. Zaborsky. 2007. *Coccidioides* niches and habitat parameters, Southwestern U.S. – a matter of scale. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111: 47-72.
- Fisher M.C., T.J. White y J.W. Taylor. 1999. Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular Ecology*. 8: 1082-1084.
- Fisher, M.C., G.L. Koeing, T.J. White y J.W. Taylor. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 94 (1): 73-84.
- Friedman L., D. Pappagianis, R.J. Berman y C.E. Smith. 1953. Studies on *Coccidioides immitis*: Morphology and sporulation capacity of forty-seven strains. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*. 42: 38-44.

- Friedman, L., D.R. Pappagianis, R.J. Berman y C.E. Smith. 1953. Studies on *Coccidioides immitis*: Morphology and sporulation capacity of forty-seven strains. *Journal of Laboratory Clinic Medicine*. 42: g38--444.
- Galgiani J.N., N.M. Ampel, A. Catanzaro, R.H. Johnson, D.A. Stevens y P.L. Williams. 2000. Practice Guidelines for the Treatment of Coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 30: 658–61.
- Galgiani J.N., N.M. Ampel, J.E. Blair, A. Catanzaro, R.H. Johnson, D.A. Stevens y P.L. Williams. 2005. *Coccidioidomycosis*. *Clinical Infectious Diseases*. 41:1217–23.
- Greene D.R., G. Koeing, M.C. Fisher y J.W. Taylor. 2000. Soil Isolation and Molecular Identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 92 (3): 406-410.
- Hanney P.W. 1975. Rodents: their lives and habitats. Segunda edición Taplinger publishing company. New York, EUA.
- Hutchinson G.E. 1957. Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 22:415-442.
- Kelsen E., R. Lima, M. Salmito, L.M. Soares, M. dos Santos y B. Wanke. 2000. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. *Mycopathologia*. 149: 57-61.
- Kirkland T. y J. Fierer. 1993. Coccidioidomycosis: A Reemerging Infectious Disease. *Emerging Infectious Disease*. 3 (2): 191-199.

- Kuenzi A.J., M.L. Morrison, D.E. Swann, P.C. Hardy y G.T. Downward. A longitudinal study of Sin Nombre Virus prevalence in rodents, southeastern Arizona. *Emerging Infectious Disease*. 5(1): 113-117.
- Lacy G.H. y F.E. Swatek. 1974. Soil ecology of *Coccidioides immitis* in Amerindian middens. *Applied Microbiology*. 29: 379-388.
- de Macedo R.CL., A.S. Rosado, F.F. da Mota, M.AS. Cavalcante, K.D. Eulalio, A.D. Filho, L.MS. Martins y B. Wanke. 2011. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiology*. 11:108
- Maddy K.T. 1957. Ecological factors possibly relating to the geographic distribution of *Coccidioides immitis*, pp. 144-157.
- Maddy K.T., H.T. Crecelius y R.G. Cornell. 1960. Distribution of *Coccidioides immitis* determined by testing cattle. *Public Health Reports*. 75 (10): 955-962.
- Marples M.J. 1961. Some extra-human reservoirs of pathogenic fungi in New Zealand. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 55:216-20.
- Marples M.J. 1966. Some observations in the ecology of *Candida albicans*, a potential mammal pathogen. *Proceedings of the New Zealand Ecology Society*. Pp. 29-34.

- Martin K.J. y P.T. Rygielwicz. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28
- Meentemeyer R.K., B.L. Anacker, W. Mark y D.M. Rizzo. 2008. Early detection of emerging forest disease using dispersal estimation and ecological niche modeling. *Ecological Applications*. 18(2): 377-390
- Millar B.C., X. Jiru, M.J. Walker, J.P. Evans y J.E. Moore. 2003. False Identification of *Coccidioides immitis*: Do Molecular Methods Always Get It Right?. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (12): 5778-5780.
- Mills J.N., T.G. Ksiazek, B.A. Ellis, P.E. Rollin, S.T. Nichol, T.L. Yates, W.L. Gannon, C.E. Levy, D.M. Engelthaler, T. Davis, D.T. Tande, J.W. Frampton, C.R. Nichols, C.J. Peters y J.E. Childs. 1997. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with sin nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the southwestern United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56(3): 273-284.
- Morisita M. 1959 Measuring of the dispersion and analysis of distribution patterns. *Memoires of the Faculty of Science, Kyushu University, Series E. Biology*. 2: 215–235..
- Nielsen N., A.L. De Obaldia y J. Heitman. 2007. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: Implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryotic Cell*. 6 (6): 949-959.

- Ochoa A.G. 1967. Coccidioidomycosis in Mexico. pp. 293-299. En: Proceedings of the 2nd Coccidioidomycosis Symposium. University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Omieczynski D.T. y F. Swatek. 1967. The Comparison of two methods for the direct isolation of *Coccidioides immitis* from soil using three different media. *Proceedings of the 2nd Coccidioidomycosis Symposium*. University of Arizona Press. Tucson, Arizona, Estados Unidos. pp. 265-272.
- Ophuls W. y H.C. Moffit. 1900. A new pathogenic mould, formerly described as a protozoan: *Coccidioides immitis* pyogenes. *Philosophical Medicine Journal*. 5:1471-1472.
- Pappagianis D. 1988. Epidemiology of Coccidioidomycosis. *Current Topics in Medical Mycology*. 2:199-238.
- Pappagianis D. y B. L. Zimmer. 1990. Serology of Coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 3(3):247-268
- Park, B.J., K. Sigel, V. Vaz, K. Komatsu, C. McRill, M. Phelan, T. Colman, A.C. Comrie, D.W. Warnock, J.N. Galgiani y R.A. Hajjeh. 2005. An epidemic of Coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998–2001. *The Journal of Infectious Disease*. 191: 1981-1987.
- Peay K.G., P.G. Kennedy y T.D. Bruns. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience*. 58(9): 799-810.

- Peterson A.T. y J. Shaw. 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous Leishmaniasis in Southern Brazil: Ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Australian Society for Parasitology*. 33: 919-931.
- Peterson A.T., M.A. Ortega-Huerta. J. Batley, V. Sanchez-Corderos, J. Soberón, R.H. Buddemeier y D.R.B. Stockwell. Future projections for Mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature*. 416: 626-628.
- Plunkett O.A. y Swatek F.E. 1957. Ecological studies of *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the Armed Forces*. Pp. 158-160.
- Reid F.A. 2006. Mammals of North America. Cuarta edición. Houghton Miffling Company. New York, Estados Unidos. Pp. 247-337.
- Reynolds H.G. 1958. The ecology of the merriam kangaroo rat (*Dipodomys merriamii*) on the grazing lands of southern Arizona. *Ecological Monographs*. 28(2): 111-127.
- Savage D. 1969. Microbial interference between indigenous yeast and Lactobacilli in the rodent stomach. *Journal of Bacteriology*. 98 (3):1278-1273.
- Schroeder H.W., J.L. Hilson y R.M. Pelmutter. 1989. Structure and evolution of mammalian VH families. *International Immunology*. 2(1): 41-50.
- Sigler L., A.L. Flis y J.W. Carmichael. 1998. *Canadian Journal of Botany*. 76(9): 1624-1633.

- Sörensen T. 1957. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Biologiske Skrifter / Kongelige Danske Videnskabernes Selskab*. 5(4):1–34.
- Stewart R.A. y K.F. Meyer. 1932. Isolation of *Coccidioides immitis* from soil specimens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society*. 29:937-938.
- Swatek F.E. 1970. Ecology of *Coccidioides immitis*. *Mycopathotogia et Mycologia Applicata*. 40(1-2):3-12.
- Swatek F.E. 1975. The epidemiology of Coccidioidomycosis. Pp. 74-102
- Swatek F.E., D.T. Omieczynski y Plunkett O.A. 1967. *Coccidioides immitis* in California. *Proceedings of the 2nd Coccidioidomycosis Symposium*, Univ. of Ariz. Press, Tucson, Arizona. Pp 255-264.
- Talamantes J., S. Behseta y C.S. Zender. 2007. Fluctuations in Climate and Incidence of Coccidioidomycosis in Kern County, California. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111: 73–82.
- Taylor J.W. y M.C. Fisher. 2003. Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 351-356.

Van Uden M. 1960. The occurrence of *Candida albicans* and other yeast in the intestinal tract of animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 89: 59-68.

Umeyama T., A. Sano, K. Kamei, M. Niimi, K. Nishimura y Y. Uehara. 2006. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 44 (5): 1859-1862.

14. ANEXO

Medio Sabouraud + antibioticos (1 Lt)

Peptona	10 gramos
Glucosa	20 gramos
Agar	20 gramos
Cloranfenicol	0.05 g diluidos en 10 ml de etanol
Ciclohexamida	0.5 g diluidos en 10 ml de acetona

Amortiguador de carbonatos o solución de recubrimiento (500 ml)

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	0.8 gramos
Bicarbonado de sodio (NaHCO_3)	1.47 gramos

Solución amortiguadora de fosfatos + tween 20 (PBST; 1 Lt)

Cloruro de Sodio (NaCl)	7.65 gramos
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	1.26 gramos
Fosfato de sodio monobásico (NaHPO_4)	0.1 gramos
KH_2PO_4	0.21 gramos
Tween 20	500 microlitros

Solución bloqueadora (100 ml)

PBST 90 ml

Suero Normal de Cabra 10 ml