

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



ANÁLISIS GENÉTICO DE *Coccidioides posadasii* y *C. immitis* EN MÉXICO

T E S I S

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

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE ANTONIO LUNA ISAAC

ENSENADA BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE DE 2010

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

ANÁLISIS GENETICO DE *Coccidioides posadasii* y *C. immitis* EN MÉXICO

TESIS

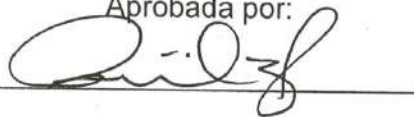
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

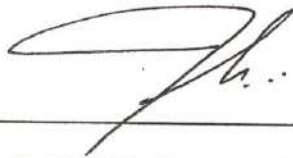
JORGE ANTONIO LUNA ISAAC

Aprobada por:



Dra. Raquel Muñiz Salazar

Directora de tesis



M. en C. Raúl C. Baptista Rosas

Sinodal



Dr. Luis M. Enríquez Paredes

Sinodal



M.S.P Patricia Radilla Chávez

Sinodal

RESUMEN

La coccidioidomicosis (CM) es una enfermedad micótica que afecta a muchos mamíferos incluyendo al humano. La situación epidemiológica actual de la CM en México se desconoce, ya que desde 1995, no se cuentan con registros de su incidencia no obstante, se presume que la situación actual de la enfermedad puede seguir un desarrollo parecido al de Estados Unidos, donde se reportan hasta 200,000 casos nuevos por año. Esta enfermedad por sus características clínicas puede ser fácilmente confundida con Tuberculosis la cuál es una enfermedad de gran importancia para el Sistema Nacional de Salud. Por ello, con base a cepas obtenidas de pacientes, resguardadas en instituciones del país se determinó la especie predominante de *Coccidioides*, su distribución genética y de que manera el genotipo tiene ingerencia sobre la forma clínica de presentación. Para ello se analizaron 8 loci de microsátélites además de la región 18S ribosomal y del Antígeno Rico en Prolina (Ag2/PRA). La especie predominante en México fue *C. posadasii* y en la región noroeste *C. immitis*. De las cepas analizadas, se obtuvieron 5 cuya especie no coincide en el análisis utilizando microsátélites y la región 18S ribosomal. El número de alelos por locus varió de 2 (KO3) a 9 (KO9) para *C. immitis* y de 1 (GAC2 y 621.2) a 12 (KO1 y KO3) para *C. posadasii*. El número total de genotipos fue de 20 para *C. immitis* de los cuales 6 fueron redundantes y para *C. posadasii* 95 genotipos de los cuales 16 fueron redundantes. La probabilidad de identidad resultó de 1/100 para ambas especies. Las comparaciones pareadas de F_{ST} para establecer la asociación de los genotipos con la forma clínica de presentación no mostraron diferencias significativas. En conjunto, los resultados del presente estudio demuestran que este hongo cuenta con una alta relación genética entre los individuos analizados. Finalmente se concluye que la asignación geográfica de los genotipos dependerá de futuros análisis de tierra empleando los mismos marcadores moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Es verdadero placer agradecer a todos los que participaron en este período de 2 años y medio que duró mi entrenamiento en esta Maestría y quiero empezando con mi familia:

A Karina mi esposa y mis hijos Jorge y Alessandra, quienes en conjunto han sido mi mayor estímulo para emprender nuevos retos y mantener una mentalidad de progreso y pensando siempre en generarles satisfacción. Gracias por su paciencia, por los momentos de convivencia que fueron pospuestos para “Cuando termine la maestría...”

A mis padres Moisés y Hermelinda a quienes todavía tengo el privilegio de ver y convivir con ellos y que en muchas ocasiones me rescataron cuando la beca no era suficiente o había terminado.

A mis hermanos María Elena, Chica, Alex y Víctor que aunque tienen sus ocupaciones han estado al tanto de mi progreso en este posgrado.

A Raquel que sin conocerme, me permitió integrarme a su equipo de trabajo y abrirme las puertas para el uso de su valioso instrumental de biología molecular y guiarme en los primeros pasos de este sorprendente campo de la ciencia.

A Raúl quien también sin conocerme, desde el primer momento me invitó a ingresar a las aulas para empezar a familiarizarme con las clases de posgrado que en ese tiempo se impartía en la escuela de Ciencias de la Salud.

A Luis por su valiosa aportación con su tiempo y conocimiento que en varias ocasiones me mostró alternativas simples para llegar a concretar resultados de forma satisfactoria.

A los maestros de la escuela de Ciencias de la Salud principalmente a David por haberme permitido integrarme a la planta docente y darme el espacio y tiempo para culminar mi trabajo de investigación.

A mis maestros del posgrado quienes me aportaron parte de sus conocimientos y experiencia de forma desinteresada.

A Angélica quien realiza su trabajo de una excelente manera y que siempre mostró una gran disponibilidad para agilizar los trámites que requerí.

A CoNaCyT que con la beca 266619 me dio la opción de ingresar al posgrado que había pospuesto por falta de ese recurso.

A todos...GRACIAS.

Esta investigación fue realizada con financiamiento de:

PROMEP Convocatoria Apoyo a la incorporación de nuevos PTC 2007 y
2009

(7103-5/072599)

Filogeografía del hongo *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* en México

INDICE

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo General.....	13
3.2 Objetivo Específicos.....	13
4. METODOLOGÍA.....	14
4.1 Obtención de muestras.....	14
4.2 Manejo de muestras clínicas.....	14
4.3 Cultivo de <i>Coccidioides</i>	15
4.4 Extracción de DNA genómico	16
4.5 Amplificación de la región 18S ribosomal	17
4.6 Amplificación de región Ag2/ ARP	18
4.7 Análisis de secuencias de 18S y Ag2.....	19
4.8 Amplificación de Microsatélites	19
4.9 Análisis de datos	20
4.9.1 Análisis de Secuencias.....	20
4.9.2 Análisis de Microsatélites	20
4.9.3 análisis de distribución geográfica	21
5. RESULTADOS	22
5.2 Cultivos Fúngicos	22

5.3 Identificación molecular de <i>C. posadasii</i> y <i>C. immitis</i>	24
5.3.1 Análisis de secuencias de la región 18S ribosomal	24
5.3.2 Análisis de secuencias de la región Ag2/ARP	25
5.3.3 Análisis de secuencias concatenadas 18S y Ag2/ARP	26
5.3.4 Amplificación del microsatélite 621.2.....	27
5.4 Análisis de Microsatélites	27
5.4.1 Análisis genético de <i>C. immitis</i>	27
5.4.2 Distribución geográfica de <i>C. immitis</i>	29
5.4.3 Distribución geográfica de <i>C. posadasii</i>	35
5.4.4 Distribución geográfica de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i> por áreas geográficas.	38
5.4.5 Análisis genético de acuerdo a la forma clínica.....	40
5.4.6 Relación Genética	43
6. DISCUSIÓN	47
6.1 Identificación molecular de especie de <i>Coccidioides</i>	47
6.3 Análisis genético poblacional	48
7. CONCLUSIONES.....	54
8. LITERATURA CITADA	56

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Número de alelos, riqueza alélica y alelos privados para <i>C. immitis</i> .	28
Tabla II. Cepas con genotipo redundante para <i>C. immitis</i>	29
Tabla III. Cepas de <i>C. immitis</i> de acuerdo al Análisis Discriminatorio	30
Tabla IV. Número de alelos, riqueza alélica y alelos privados <i>C. posadasii</i> ..	32
Tabla V. Muestras con genotipo redundante de <i>Coccidioides posadasii</i>	34
Tabla VI. Análisis isdiscriminante utilizando muestras de <i>C. posadasii</i>	36
Tabla VII. Porcentajes de asignación por región.....	39
Tabla VIII. Matriz de comparaciones pareadas <i>Coccidioides spp.</i>	40
Tabla IX. Análisis Discriminatorio realizado por la forma clínica	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>Coccidioides spp.</i> en medio líquido GYE 2X..	23
Figura 2. Extracción de DNA genómico de cepas de <i>Coccidioides.</i>	24
Figura 3. Secuencias concatenadas de la región 18S y Ag2/ARP.	26
Figura 4. Distribución por coordenadas de <i>C. immitis</i> producto del análisis discriminatorio..	31
Figura 5. Distribución por coordenadas de <i>C. posadasii</i> producto del Análisis Discriminatorio.....	37
Figura 6. Distribución por coordenadas de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i> producto del Análisis Discriminatorio.....	38
Figura 7. Distribución de <i>Coccidioides spp.</i> por la forma clínica de presentación producto del análisis discriminante.....	42
Figura 8. Árbol genético generado a partir de la combinación de las secuencias de la región 18S y AG2/ARP	43
Figura 9. Distribución de haplotipos obtenidos de la combinación de secuencias de 18S y Ag2/ARP de <i>C. immitis</i>	45
Figura 10. Distribución de haplotipos obtenidos de la combinación de secuencias de 18S y Ag2/ARP de <i>C. posadasii.</i>	46

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1	63
Apéndice 2	67
Apéndice 3	68
Apéndice 4	69

1. INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis (CM) es una enfermedad micótica infecciosa endémica de las zonas desérticas de América que afecta principalmente a mamíferos, incluyendo al hombre (Baptista-Rosas & Riquelme 2007).

En México, las áreas endémicas de CM se distribuyen principalmente en la frontera norte en los estados de Baja California, Sonora, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Baptista-Rosas & Riquelme 2007), que colindan con Estados Unidos, y cuentan con un alto flujo de migrantes temporales (INM 2009). A partir de 1995, la CM fue excluida del informe para el registro epidemiológico nacional, por lo que no se cuentan con registros actuales de su incidencia y prevalencia en México. Sin embargo, es probable que la situación en México sea similar a la de EUA, donde se han reportado hasta 200,000 casos de primoinfección anualmente (Chiller et al. 2003; Buckley 2008).

La CM y la tuberculosis (TB), comparten características epidemiológicas, clínicas y radiográficas, lo que dificulta considerablemente el diagnóstico. En México, la coexistencia de TB y CM en regiones endémicas para ambos padecimientos, como ocurre en el norte del país, complica el diagnóstico, por lo que el retraso en la identificación de cualquiera de estos dos padecimientos,

afecta de forma negativa el pronóstico del paciente (Castañeda-Godoy & Laniado-Laborin 2002).

El cultivo de *Coccidioides* a partir de especímenes clínicos, tiene la desventaja de ser altamente infeccioso, por requerir niveles de bioseguridad nivel 3 (BSL3) y por lo menos 5 días para el desarrollo del organismo. Actualmente, la mayor parte de los hospitales en el país, envían las muestras con sospecha clínica de CM al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) en la ciudad de México para su identificación. Sin embargo, los resultados pueden tardar de 2 – 9 meses, complicando la salud del paciente (Laniado-Laborin 2000). En los últimos años, las técnicas de biología molecular han sido utilizadas ampliamente en la identificación de agentes infecciosos patógenos (Tang et al. 1997; Collins & Grange 1999; Dixon 2001). Los métodos moleculares tienen la ventaja de ser más específicos, más rápidos, se requiere una cantidad mínima de muestra y no es indispensable el cultivo de los organismos. Dado que los resultados se pueden obtener en un tiempo menor que el cultivo microbiológico, permite iniciar el tratamiento específico en una etapa temprana y disminuye la probabilidad de progresión de la enfermedad (Jackson et al. 1996). Además, la información molecular permite comparar las características genéticas del patógeno aislado de la muestra clínica con las del patógeno del medio ambiente (Bart-Delabesse E 1998). Actualmente existen marcadores moleculares que permiten identificar por

separado a *Coccidioides posadasii* o *C. immitis* (Fisher et al. 1999; Bialek et al. 2004; Umeyama et al. 2006). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que demuestren si existe relación entre la especie de *Coccidioides* y la severidad del cuadro clínico en el paciente.

En este estudio se identificó molecularmente la especie de *Coccidioides* de cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes, resguardadas en ceparios de Instituciones de Salud (InDRE, Hospital General de Tijuana, INER, Jurisdicción de Salud de Ensenada) y académicas (Departamento de Micología Médica de la UNAM). Las cepas datan del año 1957 al presente. Es importante resaltar que dicha cepas solo habían sido identificadas como *Coccidioides spp.* mediante cultivo microbiológico. La información que se obtenga de este estudio permitirá (i) Determinar la especie predominante de *Coccidioides* en México, (ii) Inferir la distribución geográfica de *C. posadasii* y *C. immitis* y (iii) Establecer si existe correlación entre los genotipos de las cepas y la forma clínica de presentación.

2. ANTECEDENTES

La coccidioidomicosis (CM) es ocasionada por un género de ascomicetos dimórficos del que hasta este momento se han identificado molecularmente dos especies: *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* (Fisher et al. 2002). El phylum *Ascomycota* es el más grande de los hongos, compuesto por casi el 50% de todas las especies fúngicas conocidas y aproximadamente el 80% de todas las especies patógenas y oportunistas. La característica básica que diferencia a los ascomicetos de otros hongos es la presencia de ascas dentro del ascoma (Guarro 1999) que es el sitio (sáculo) donde transporta sus esporas.

El hongo tiene dos etapas de vida: una saprotrófica, que se lleva a cabo en el suelo en forma de micelio y otra parasitaria que se desarrolla en los hospederos. En la etapa saprotrófica (fase micelial o ambiental), el hongo forma ramificaciones llamadas hifas, donde se desarrollan las artroconidias. Conforme los artroconidios maduran, se estabilizan y fácilmente son aerotransportados. Una vez que los artroconidios son inhalados y llegan a los bronquiolos (fase parasitaria), estos se transforman en una estructura esférica multinucleada conocida como esférula, la cual comienza un proceso de división interna produciendo centenares de endosporas uninucleadas. Cuando la esférula madura las endosporas son liberadas y forman nuevas esférulas en los tejidos. Si estas se liberan al medio ambiente y se depositan sobre suelo,

estas pueden convertirse nuevamente a su forma micelial (Hagman 2000; Muñoz B 2004).

La CM es una infección resultante de la inhalación de artroconidios de *Coccidioides*, por lo que la exposición al ambiente en áreas endémicas incrementa el riesgo de infección. La CM no se transmite de persona a persona o a través de vectores (Pappagianis 1988). La mayoría de las infecciones coccidioidales son autolimitantes, solo el 5 al 10 % resultan en cuadros clínicos de importancia de las cuales muy pocas tienen efectos a largo plazo (Galgiani 1999). El 60% de los individuos que se infectan de *Coccidioides* spp. se mantienen asintomáticos y el resto manifiestan los primeros síntomas entre 7 a 21 días posterior a la inhalación de los artroconidios (Saubolle et al. 2007).

Las características clínicas de la CM puede ser una gripe, tos, fiebre, sudoraciones nocturnas, fatiga generalizada, debilidad, anorexia, pérdida de peso, o dificultad respiratoria (Kilgore 2000). Pueden apreciarse hallazgos anormales en radiografías de tórax hasta en la mitad de pacientes sintomáticos e incluso en pacientes asintomáticos (Batra 1992). La mayoría de los síntomas generalmente desaparecen de 2 a 3 semanas, aunque en algunos pacientes les puede tomar semanas o meses para que los síntomas desaparezcan. Algunos reportes muestran que los afroamericanos tienen un mayor riesgo de

adquirir la enfermedad, sin haber identificado hasta el momento diferencias genéticas específicas que coloquen a estas poblaciones en mayor peligro (Louie et al. 1999). Por otro lado, reportes de California, EUA indican que la población caucásica es la que presenta el mayor número de casos, en donde el número de casos en hombres es el doble que en mujeres (CDC, 2009). Hasta el momento, no hay datos que concluyan si existe diferencia entre razas para adquirirla (Laniado-Laborin et al. 1991; Valdez 2008).

En Estados Unidos el área endémica para CM, incluye el Valle de San Joaquín, la región central del desierto de Arizona, el Valle de San Joaquín en California y extensas zonas áridas de Nevada, Nuevo México y Texas (Chiller et al. 2003). Por otro lado, existe evidencia de un foco endémico de CM en la región noreste de Utah, en donde se diagnosticaron a 5 trabajadores de arqueología como positivos a CM (Petersen & Haddad 2004), con lo cual se expande la distribución geográfica en EUA. La zona endémica en México, incluye la región fronteriza norte, abarcando los estados de Baja California, Sonora, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Castañón Olivares 2004; Baptista-Rosas & Riquelme 2007). Esta área está circunscrita a la frontera más transitada del mundo, donde también se reportan altas prevalencia de TB e infección por VIH/SIDA, las cuales son enfermedades con cuadros clínicos indistinguibles a los de la CM pulmonar (Castañeda-Godoy & Laniado-Laborin 2002).

En un estudio realizado en la ciudad de Tijuana, Baja California, se identificó macroscópicamente a *Coccidioides immitis* de muestras ambientales obtenidas de la zona central de la ciudad, lo que sugiere un riesgo de infección aún en las zonas más urbanizadas dentro de la región endémica. En el mismo estudio las pruebas cutáneas con coccidioidina, demostraron una prevalencia global de infección del 10%, estos datos aunados a la presencia de casos clínicos, le confieren al sitio en cuestión los requisitos para ser considerada zona endémica (Laniado-Laborin et al. 1991). Otro estudio realizado en la misma ciudad, se reportó que 1 de cada 6 casos de pacientes con diagnóstico clínico microbiológico de TB fueron positivos a CM (Burgueño-Duarte 1997).

En las dos últimas décadas se ha incrementado notablemente el reporte de casos y brotes epidémicos de CM en Estados Unidos, relacionados con factores ambientales como movimientos telúricos y vientos, los cuales provocan la aerolización y dispersión de arthroconidios (CDC 2001). Se estima que sólo en Estados Unidos existen 200,000 casos anuales de infecciones nuevas por *Coccidioides spp.* (Chiller et al. 2003; Buckley 2008). En el sur de California, se reportan tasas de prevalencia por arriba de 40 casos por 100 mil habitantes y durante brotes epidémicos por arriba de 500 casos por 100 mil habitantes (Kirkland & Fierer 1996). La situación epidemiológica actual de la CM en México se desconoce ya que desde 1995 la CM fue excluida del informe

para el registro epidemiológico nacional. No obstante, se presume que la situación actual de la CM en México, puede estar siguiendo un desarrollo parecido al de Estados Unidos, por compartir condiciones ambientales similares entre las dos regiones endémicas que son fronterizas (Baptista-Rosas & Riquelme 2007).

La CM fue considerada anteriormente como estacional por presentarse solo en algunas épocas del año, sin embargo, en la actualidad se sabe que esta micosis puede presentarse en cualquier época. Esta situación ocurre frecuentemente en áreas endémicas que se encuentran entre poblaciones con crecimiento masivo y poblaciones con turismo de zonas no endémicas los cuales son más susceptibles a enfermarse, incrementando de esta manera el número de personas en riesgo así como el número de pacientes diagnosticados con CM fuera de estas áreas (Saubolle et al. 2007). Algunos estudios reportan que existe una estrecha correlación de la enfermedad con eventos atmosféricos climáticos y meteorológicos (Zender 2006). Estudios bioclimáticos sugieren que el Valle de Mexicali y la costa del Golfo de California de Baja California, son áreas importantes para el desarrollo de *Coccidioides*. Sin embargo, la región más meridional de Baja California, es la que reúne las condiciones más favorables para el desarrollo de la enfermedad, por el grado de humedad presente (Baptista-Rosas 2008),

El diagnóstico definitivo se establece cuando el organismo es aislado de una muestra clínica. El hongo crece en la mayoría de los medios micológicos en un amplio rango de temperatura (22-40 °C) y bajo condiciones nutricionales muy simples, creciendo prácticamente en cualquier medio (Sangre, corazón, sabouraud, glucosa-extracto de levadura). Estudios reportan que *Coccidioides* prefiere los ambientes salinos, incluyendo los fluidos corporales (Lawrence 1968). Crece relativamente rápido y es visible 2 días después de su inoculación, aunque el tiempo óptimo es de cinco días o más (Chiller et al. 2003). Experimentos de crecimiento muestran que *C. posadasii* presenta tasas de crecimiento considerablemente más lentas en medios de cultivo altos en sal, comparado con *C. immitis*, sugiriendo que pueden existir otros caracteres fenotípicos que hacen diferentes a estas dos especies (Fisher et al. 2002)

La identificación de *Coccidioides* se realiza utilizando diferentes técnicas diagnósticas. El “estándar de oro” es el cultivo micológico el cual proporciona un diagnóstico definitivo del hongo, sin embargo se debe manejar bajo condiciones de Bioseguridad Nivel 3 (BSL3), lo cual implica la utilización de mayores recursos (Burt A 1997; Cordeiro et al. 2007). Las pruebas histopatológicas tienen como ventaja que al observar al organismo en el tejido analizado, se obtiene un diagnóstico preciso del agente causal, sin embargo la gran desventaja, es que es una técnica invasiva. Además, existe el riesgo de no se tome la biopsia en el lugar correcto donde se encuentre el hongo, el

tiempo de procesamiento. La serología como herramienta diagnóstica, permite obtener resultados rápidos, la más utilizada es la fijación del complemento donde los anticuerpos presentes en la sangre del paciente, se adhieren al antígeno presente en la prueba dando un resultado, la desventaja principal es el tiempo en que se toma la muestra al paciente y la inmunoglobulina analizada, considerando que IgM es considerada como de fase aguda e IgG de curso crónico. Las técnicas moleculares se han utilizado con gran éxito para la identificación de *Coccidioides* en diversas situaciones clínicas (Zimmermann et al. 1994) utilizó la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) para caracterizar 15 aislamientos clínicos de *Coccidioides*, reportando la presencia de dos grupos. La región del espaciador interno de transcripción (ITS), ha sido amplificado de DNA extraído de muestras de tierra y de cultivo de *Coccidioides* aislado de ratones infectados experimentalmente con este hongo (Greene et al. 2000). Umeyama(2006) diseñó un par de oligonucleótidos que amplifica la región 18S ribosomal y permite diferenciar entre *C. posadasii* y *C. immitis*, debido a que existe una deleción de 86 pb en *C.posadasii*. El análisis molecular de una región como elemento único de identificación, puede propiciar errores de caracterización, por lo que se recomienda utilizar técnicas moleculares conjuntas o la amplificación de varias regiones que junto a éstas nos de mayor resolución en la identificación (Millar et al. 2003). Sondas de DNA para amplificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP's) han sido utilizados para diferenciar cepas de *C immitis* y *C. posadasii*, sin embargo se

han identificado inconsistencias en la amplificación de la Hexoquinasa 149, por lo que se considera que no es suficiente para diferenciar entre especies (Castañón et al. 2007). La región del antígeno rico en prolina (Ag2/PRA) también ha sido utilizada para identificar a *Coccidioides* de muestras de aislamientos clínicos (Bialek et al. 2004). Por otra parte, Fisher et al. (1999), desarrolló nueve oligonucleótidos para amplificar regiones de microsatélites, los cuales han resultado ser polimórficos lo que permite utilizarlos como herramienta en el análisis de genética poblacional, dentro de estos primers, existen 2 pares de microsatélites (621.2 y GAC2), que permiten diferenciar entre *C. immitis* y *C. posadasii*.

La extracción de DNA de *Coccidioides* spp. se ha realizado a partir de diferentes tipos de muestras; tierra de áreas endémicas (Greene et al. 2000; Baptista-Rosas 2008), muestras clínicas a partir de suero sanguíneo (Johnson et al. 1998) y esputo (Cordeiro et al. 2007). Incluso, se logró obtener DNA de restos del individuo portador del primer caso diagnosticado con CM resguardados en un museo (Canteros et al. 2009).

Por lo anterior expuesto y para dar continuidad a los esfuerzos realizados por otros investigadores en la búsqueda del entendimiento general de este hongo patógeno, se requiere generar en nuestro país información nueva en todas las áreas que involucren a *Coccidioides* spp. Este estudio,

analizó cepas de muestras clínicas de pacientes en México utilizando ocho loci de microsatélites y dos regiones del genoma de este hongo (18S y Ag2), los cuales ya han sido empleados por otros autores con buenos resultados (Fisher, 2002; Jewell, 2008; Umeyama, 2006; Bialek, 2004). La información generada en este trabajo permitirá establecer bases para el diagnóstico y control de la enfermedad en México.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Identificar molecularmente las características genéticas de *Coccidioides posadasii* y *C. immitis* a partir de cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes en México.

3.2 Objetivo Específicos

1. Identificar molecularmente la especie de *Coccidioides* en cepas aisladas de muestras clínicas de pacientes en México.
2. Analizar las características genéticas de *C. posadasii* y *C. immitis*.
3. Determinar la distribución geográfica de *C. posadasii* y *C. immitis*
4. Determinar si existe relación entre los genotipos de *C. posadasii* y *C. immitis* y la forma clínica de presentación.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención de muestras

Se analizaron un total de 158 cultivos de cepas provenientes de muestras clínicas resguardadas en ceparios del Laboratorio de Micología Médica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, 88 cepas) y del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (InDRE, 62 cepas). También se obtuvieron muestras clínicas de pacientes del Hospital General de Tijuana (HGT, 5 cepas) y del Instituto de Servicios de Salud del Estado de Baja California, Jurisdicción de Ensenada (ISESALUD) (3 cepas) (Apéndice 1). Dichas muestras comprenden un período de colecta entre 1957 y 2010.

4.2 Manejo de muestras clínicas

Los cultivos obtenidos de los ceparios de UNAM e InDRE fueron reinoculados, en medio líquido Sabouraud con antibióticos cloramfenicol (25 µg/mL) y cicloheximida (25 µg/mL) en criotubos de 2 mL y conservados a temperatura ambiente hasta su cultivo. Posteriormente, estos reinoculos se cultivaron (200 µL) en medio Sabouraud sólido (Difco™ Sabouraud Dextrose Agar) con cloramfenicol (25µg/ml) y cicloheximida (25µg/ml) (SIGMA). Las muestras de los cultivos aislados se preservaron en 1 mL de medio líquido

GYE 2x y se le agregó 1 mL de 30% glicerol, quedando a una concentración final del 15%; se dejaron impregnar a temperatura ambiente por 20 minutos y se almacenaron a -70°C .

El cultivo microbiológico se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California, siguiendo la normatividad vigente para el manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) descrita en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y utilizando campana de Bioseguridad Clase II que aunado a las medidas complementarias de bioseguridad descrita en protocolos internacionales permiten contar con medidas de Bioseguridad nivel 3 (BSL3) (Salud 2005)

4.3 Cultivo de *Coccidioides*

El cultivo de la colonia fúngica para el crecimiento en fase saprobiótica se realizó en medio líquido GYE 2X [D(+)-Glucosa Monohidrato (EMD Chemicals Inc) y extracto de levadura (AMRESCO)] esterilizado a 121°C por 15 minutos con 20 libras de presión. Se adicionó al medio de cultivo 1 mL de cloramfenicol ($25\ \mu\text{g}/\text{mL}$) y 1 mL de cicloheximina ($25\ \mu\text{g}/\text{mL}$). Se inoculó 300 μL del cultivo resguardado en medio GYE 2X en 75 mL del mismo medio de cultivo y se incubó a 28°C por 5 días en agitación continua. El desarrollo fúngico fue considerado adecuado cuando los micelios ocupaban la totalidad

del medio en el matraz (Fig. 1A y B). Con el objetivo de inactivar la fase patógena (micelio), todos los cultivos fueron esterilizados a 100°C por 15 minutos (Burt et al. 1995), condiciones que son letales tanto para formas saprobióticas como parasitarias de *Coccidioides*. Al mismo tiempo, se probaron otras dos nuevas condiciones de temperatura y tiempo, para evaluar la inactivación del hongo. La primera fue 121° C por 15 minutos con 20 lbs. de presión y la segunda de 121°C por 10 minutos con 20 lbs. de presión. Concluido el tiempo de esterilización se dejó enfriar el medio de cultivo y se inoculó 1 ml en medio líquido GYE 2x a 28°C por 7 días y el resto se resguardó a 4°C. Si al termino de este tiempo no se observaba desarrollo de micelio, se determinaba que la fase patógena había sido inactivada, por lo que el cultivo era seguro para su manejo y posterior extracción de DNA genómico.

4.4 Extracción de DNA genómico

El cultivo inactivado se filtró con gasas estériles para concentrar el tejido fúngico. Posteriormente se homogenizó con un dispositivo automático Omni TH International (Omni Intenational Kennesaw, GA) y la extracción de DNA se realizo con el kit comercial Ultra Clean DNA (Mobio) con modificaciones menores. La temperatura de incubación fue de 65 °C por 20 min, agitándose en vortex por 15 s cada 5 min para finalmente concentrarse en 25 µL de la solución del kit. Para comprobar la calidad y cantidad del DNA, se

realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100V por 25 minutos, y teñido con *Gelstar* (Lonza Rockland, Inc) por 15 minutos para su visualización con luz UV.

4.5 Amplificación de la región 18S ribosomal

Para identificar la especie de *Coccidioides* se amplificó la región no asociada a ITS localizada en SSU 18S, que codifica para un gen ribosomal. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para *Coccidioides*, diseñados por Umeyama et al. (2006), Coi9-1F (5'-TACGGTGTAAATCCCGATACA) y Coi9-1R (5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA). El producto esperado para *C. immitis* fue de 720 pb y para *C. posadasii* de 632 pb. Las condiciones de la reacción de PCR fueron para un volumen final de 25 μ L, con 2.5 μ L de 10X Buffer, 1.5 μ L de 100X BSA, 5 μ L de 1 mM dNTP's, 0.5 μ L de cada 10 μ M oligonucleótido, 1.5 μ L de 25 mM $MgCl_2$, 0.25 μ L de 5U *Taq* DNA polimerasa recombinante (SIGMA) y 20 ng de DNA genómico. El perfil de temperatura fue 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 45 s, 1 ciclo de extensión a 72°C por 3 min. Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100 Volts durante 25 minutos y se tiñeron con *Gelstar* (Lonza Rockland, Inc) para su visualización con luz UV.

4.6 Amplificación de región Ag2/ ARP

Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Bialek et. al. (2004) para amplificar la Región del Antígeno Rico en Prolina (Ag2/ARP) utilizando PCR anidada, oligonucleótidos externos Coccil 5'-GTACTATTAGGGAGGATAATCGTT), Coccill (5'-GGTGTCAACTGGTGGGATGTCAAT), e internos Cocci III (5'-ATCCCACCTTGCGCTGTATGTTCGA), CocciIV (5'-GGAGACGGCTGGATTTTTTAACATG).

Las condiciones de la PCR fue para un volumen final de 25 μ L, con 2.5 μ L de 10X Buffer, 1.5 μ L de 10mg/mL BSA, 5 μ L de 1 mM dNTP's, 0.5 μ L de cada oligonucleótido, 10 μ M, 1.5 μ L de 25 mM MgCl₂, 0.25 μ L de 5U *Taq* DNA polimerasa recombinante (SIGMA) y 20ng de DNA genómico. El perfil de temperatura para amplificar la región externa fue: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s y 72°C por 60 s, finalizando con 1 ciclo de extensión a 72°C por 5 min. Para la región interna fue 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 60 s, finalizando con 1 ciclo de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.4% durante 25 minutos a 100 V y se tiñeron con *Gelstar* (Lonza Rockland, Inc) una dilución 1:2 de tinción y agua destilada. Se vertió la tinción sobre el gel y se incubó en la obscuridad durante 15 minutos para finalmente observarlo con lámpara U.V. con una longitud de onda de 302 nm para visualizar el tamaño del fragmento amplificado.

4.7 Análisis de secuencias de 18S y Ag2

Los productos amplificados tanto del gen 18S y Ag2, se purificaron utilizando ExoSap (USB) y se secuenciaron utilizando nucleótidos terminadores de secuencia (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) y procesadas en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Automated Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems) con la compañía SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) en San Diego, California EUA.

4.8 Amplificación de Microsatélites

Se utilizaron nueve pares de oligonucleótidos diseñados por Fisher et. al (1999), de los cuales, los forward fueron marcados con los siguientes fluoróforos FAM (621.2, GA37, KO9, ACJ y GAC2), VIC (KO7 y GA1) y NED(GA37,KO1 y KO3). La reacción de PCR para todos los oligonucleótidos se realizó en un volumen final de 10 µL con 1 µL de 10 X buffer, 0.6 µL de 1 mM dNTPs, 1.2 µL de 25 mM MgCl₂, 0.4 µL de cada 10 µM oligonucleótido, 0.2 µL de 10 mg/mL BSA y 0.1µL de 5U *Taq* DNA polimerasa con 20 ng de DNA genómico. Las condiciones del termociclador fueron 94 °C 60 s, 94°C 30 s, 58 °C 30 s 72 °C 45 s (35 ciclos) para todos los oligonucleótidos, excepto para el 621.2 que fue de 64 °C, y una extensión de 72 °C por 7 minutos. Todos los productos amplificados se analizaron con un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Automated Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems) en la

compañía SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) en San Diego, California, EUA.

4.9 Análisis de datos

4.9.1 Análisis de Secuencias

La revisión y edición de los cromatogramas de las secuencias de ambos genes amplificados se realizó con el software Codon Code Aligner (Codon Code Corporation 2006). La alineación de las secuencias editadas se realizó mediante el programa ClustalX (Thompson et al. 1997) implementado en MEGA versión 4.1 (Tamura et al. 2007). El número de haplotipos se determinó con DNaSP V. 5.0 (Librado 2009). Las relaciones genéticas entre cepas fueron determinadas a partir de la información de las secuencias. Los arboles genéticos se realizaron con el programa MEGA 4 (Tamura et al. 2007).

4.9.2 Análisis de Microsatélites

Los archivos de los electroferogramas se analizaron con el programa GeneMarker versión 1.85 (LLC 2009) para asignar el tamaño de cada uno de los fragmentos amplificados (Selkoe & Toonen 2006). El tamaño de los alelos fue determinado utilizando un método estandarizado publicado por Fisher et. al. (2002) (www.plantbio.berkeley.edu). El número de alelos por locus, frecuencias

alélicas y genotipos redundantes (idénticos) fue determinado con el programa MSTools versión 3.1.1 (Park 2001). La riqueza alélica fue determinada con FSTAT versión 2.9.3.2 (Goudet 2001) y el número de alelos privados con GDA versión 1 (Lewis & Zaykin 2001).

4.9.3 análisis de distribución geográfica

Las cepas fueron agrupadas de acuerdo a su origen geográfico obtenido del historial clínico (Apéndice 1). Así también, estas cepas se agruparon en cuatro regiones: Noroeste (Baja California, Sonora, Chihuahua, Sinaloa) Noreste (Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas) Centro (D.F, Edo. De Méx, Michoacán, Guerrero) y ND (Sin procedencia). Por último, se hizo una agrupación de acuerdo a la presentación clínica como Cutánea, Diseminada Cutánea, Diseminada inespecífica y Pulmonar.

El número de grupos fue determinado con el Análisis Discriminante implementado en STATISTICA versión 7 (StatSoft 2004). El análisis de comparaciones pareadas de frecuencias alélicas (F_{ST}) fue determinado con el programa Arlequin versión 3.11 (Excoffier et al. 1992), donde se aplicó la corrección de Bonferroni para muestras multipareadas (Bonferroni 1936). La distancia genética de entre pares de individuos fue calculada con el programa GENEALX versión 6.4 (Peakall & Smouse 2006).

5. RESULTADOS

5.2 Cultivos Fúngicos

De las pruebas de inactivación en autoclave realizadas para verificar la inactivación del patógeno, se observó que a 121 °C por 15 min con 20 lbs de presión se inactivó de manera eficiente ya que no se registró crecimiento en la reinoculación posterior. Sin embargo, el DNA sufrió una fuerte degradación lo que impidió de forma total o parcial la amplificación de las regiones de interés. Por otro lado a 121 °C por 10 min, el hongo sobrevivió y además al ser reinoculado desarrolló un crecimiento acelerado, observándose el desarrollo de los filamentos a los 2 días, comparado con 5 días de crecimiento de una inoculación promedio, además el crecimiento desarrolló una masa de mayor dimensión y grosor comparada con otros cultivos (Fig.1C y D). El tercer experimento a 100°C por 15 min, fue el que mostró mejores resultados, lográndose inactivar al hongo, confirmándolo con un nulo crecimiento en la reinoculación y obteniéndose una cantidad y calidad suficiente de DNA para lograr amplificar las regiones de interés (Fig. 2).

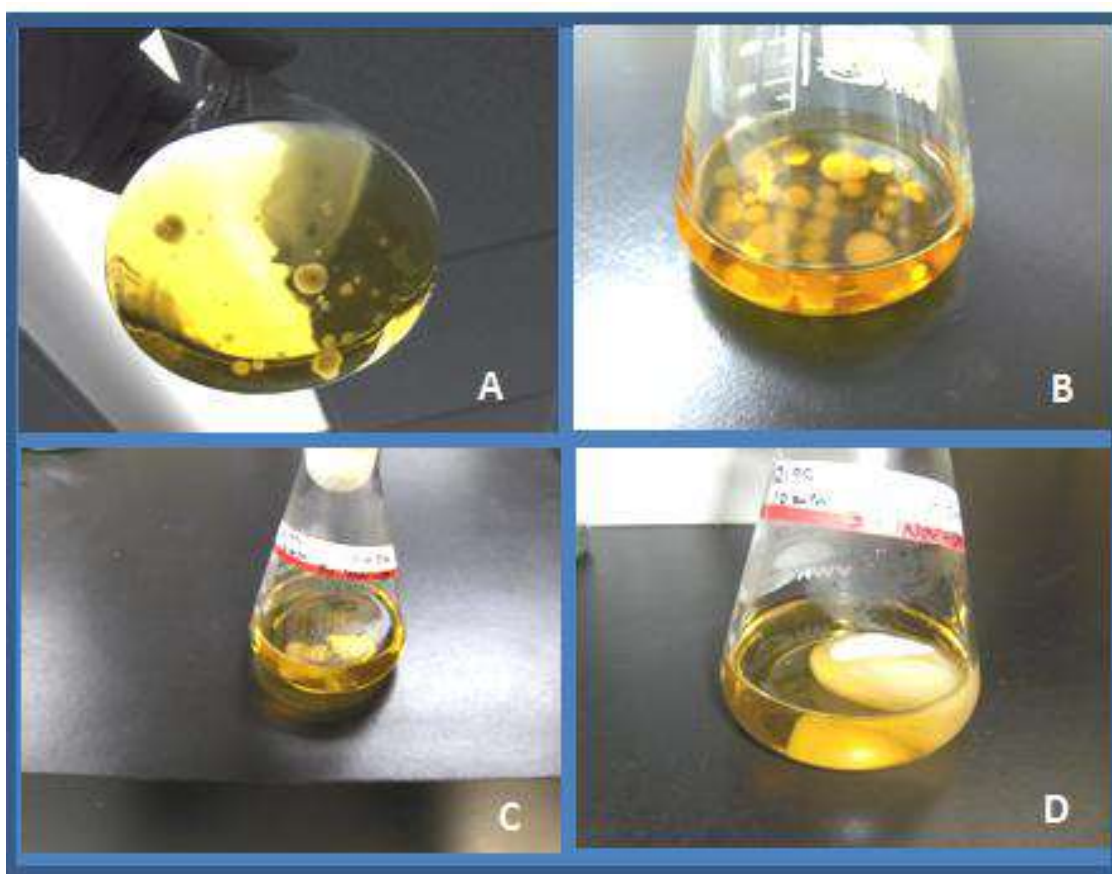


Figura 1. Cultivo de *Coccidioides spp.* en medio líquido GYE 2X. A y B) cultivo a 28 °C por 3 y 5 días respectivamente. C y D) cultivo de un reinoculo de cultivo autoclavado a 121 °C por 10 minutos de 3 y 5 días respectivamente.

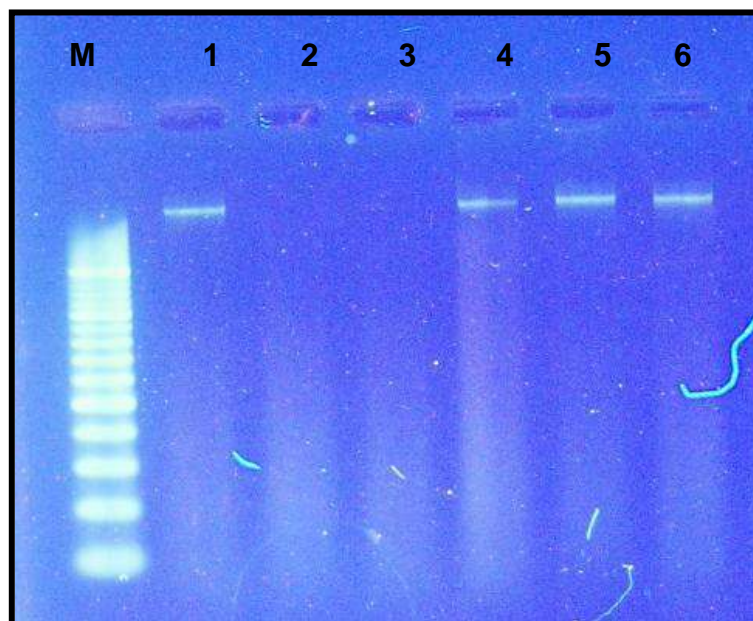


Figura 2. Extracción de DNA genómico de cepas de *Coccidioides*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, 100 V por 25 minutos. M = Marcador Molecular. Línea 1, 4, 5 y 6 se aprecia DNA genómico de buena calidad y líneas 2 y 3 se aprecia DNA degradado.

5.3 Identificación molecular de *C. posadasii* y *C. immitis*

5.3.1 Análisis de secuencias de la región 18S ribosomal

Se amplificó un total de 145 muestras, de las cuales 21 mostraron un fragmento de 720 pb y 124 de 630 bp, lo que indica que las muestras son *C. immitis* y *C. posadasii*, respectivamente. Los fragmentos amplificados se secuenciaron, obteniendo 116 secuencias de buena calidad las cuales fueron editadas, alineadas y comparadas con las amplificadas por Umeyama et al. (2006) (*C. posadasii* = Cp45809 No. de acceso AB597182 y *C. immitis* = Ci45815 No. de acceso AB597180). El 100% de las secuencias se alinearon perfectamente con las de Umeyama (2006), confirmándose que 19 cepas son

C. immitis y 97 son *C. posadasii*. Las cepas con etiquetas CiBC01, CiCHI02, CiBC06, CiEU02 y CiBC09 tuvieron secuencias correspondientes a *C. posadasii* mientras que para las otras regiones analizadas (Ag2/PRA y microsátélites), se identificaron como *C. immitis*. Se obtuvieron un total de siete haplotipos para *C. posadasii* y dos para *C. immitis*.

5.3.2 Análisis de secuencias de la región Ag2/ARP

Se amplificó un total de 143 muestras obteniéndose un producto de 526 pb. Los fragmentos amplificados se secuenciaron, obteniéndose 123 secuencias de buena calidad, las cuales fueron editadas, alineadas y comparadas con la secuencia de *C. posadasii*, cepa Silveira (No. de acceso AF013256) de 3823 pb. Al realizar la alineación se observó una delección de 12 pb entre la posición 997 a 1008 pb, exclusivamente en muestras que habían sido identificadas como *C. immitis* con la región 18S. De esta manera, se logró utilizar a la región de Ag2/ARP para diferenciar entre *C. immitis* y *C. posadasii*. De acuerdo a este criterio se logro identificar a 24 cepas como *C. immitis* y 99 como *C. posadasii*. Se identificaron un total de tres haplotipos para *C. posadasii* y uno para *C. immitis*.

5.3.3 Análisis de secuencias concatenadas 18S y Ag2/ARP

Se combinaron las secuencias de la región 18S con las de Ag2/ARP de ambas especies de *Coccidioides* con el programa DNASP, identificándose un total de 11 haplotipos para *C. posadasii* y cuatro para *C. immitis* (Figura 3).

Espece	Haplotipo	f	18S	Ag2
<i>posadasii</i>	Cp01	58	GC-ACAAGGCGAC	CTGGAACCTCACGCGA--AA
<i>posadasii</i>	Cp02	22	..-.....C.--..
<i>posadasii</i>	Cp03	1	..-.....C.--..
<i>posadasii</i>	Cp04	2	..-.-.-..--..
<i>posadasii</i>	Cp05	1	.G-.....--..
<i>posadasii</i>	Cp06	3	..-.....T...--..
<i>posadasii</i>	Cp07	1	..-.T.....--..
<i>posadasii</i>	Cp08	1	..-G.....T..--..
<i>posadasii</i>	Cp09	2	..-G.....--..
<i>posadasii</i>	Cp10	2	..-.....T...--..
<i>posadasii</i>	Cp11	1	..-.....---..
<i>immitis</i>	Ci01	18	..A.....--	T-----G..AAG-
<i>immitis</i>	Ci02	1	..-.....	T-----G..AAG-
<i>immitis</i>	Ci03	1	..-.....-	T-----G..AAG-
<i>immitis</i>	Ci04	1	C.A.....--	T-----G..AAG-

Figura 3. Secuencias concatenadas de la región 18S y Ag2/ARP. Se muestran las deleciones e inserciones para cada secuencia y el haplotipo resultante de su unión. f = frecuencia (numero de muestras que presentaron el haplotipo correspondiente).

5.3.4 Amplificación del microsatélite 621.2

Con base en la amplificación del locus 621.2, se identificaron 28 muestras como *C. immitis* y 127 como *C. posadasii*. Las cepas de *C. posadasii* presentan alelos de 397 a 401 pb, mientras que *C. immitis* de 414 a 426 pb. Esta diferencia en el tamaño de los alelos permite diferenciar ambas especies (Fisher et al. 2002). Es importante resaltar que la identificación molecular de especies utilizando la región 18S, Ag2/PARA y el locus 621.2 coincidieron en todas las muestras, con excepción de las etiquetadas como CiBC01, CiCHI02, CiBC06, CiEU02 y CiBC09.

5.4 Análisis de Microsatélites

Se amplificaron un total de 155 muestras con nueve loci de microsatélites, las cuáles se agruparon de acuerdo a la identificación de especie amplificando el gen 18S. Sin embargo, el locus GA1 se eliminó del análisis genético debido a que mostró muchas inconsistencias, quedando solo ocho loci.

5.4.1 Análisis genético de *C. immitis*

El número total de alelos detectados por locus varió de 2 en KO3 a 9 en KO9. La riqueza alélica varió de 1.1 en KO3 a 2.2 en GAC2. Se detectaron

alelos privados en todos los loci con excepción del GAC2. El locus con el mayor número de alelos privados fue ACJ (5) (Tabla I; Apéndice 2). El número total de genotipos para *C. immitis* fue 20, de los cuales 14 fueron únicos y seis redundantes. La probabilidad de identidad estimada para observar genotipos idénticos multilocus entre dos individuos muestreados a partir de una población (P_i) resultó de 1/100.

Tabla I. Número de alelos, riqueza alélica y alelos privados determinados en el presente estudio para *C. immitis*.

Locus	Número de alelos	Riqueza alélica	Alelos privados
KO9	9	1.9	4
621.2	6	1.7	3
GA37	4	1.7	2
ACJ	7	1.7	5
KO7	3	1.3	1
KO1	3	1.1	2
GAC2	6	1.9	0
KO3	2	1.2	1
TOTAL	40	1.6	18

Las cepas con genotipos redundantes, son de sitios geográficos diferentes. Por ejemplo, el individuo CiCHI03 clasificado como de Chihuahua, comparte genotipo con el individuo CiEDMEX01 del Edo. de México. Solo dos pares de genotipos redundantes pertenecen al mismo sitio geográfico, Baja California (CiBC04-CiBC09 y CiBC08-CiBC10) (Tabla II).

Tabla II. Cepas con genotipo redundante para *C. immitis*.

Genotipo	Nombre de cepa
1	CiND01, CiBC05
2	CiBC03, CiBC07, CiCOAH02
3	CiBC04, CiBC09
4	CiBC08, CiBC10
5	CiCHI03, CiEDMEX01
6	CiCOAH01, CiSON01, CiSON02

5.4.2 Distribución geográfica de *C. immitis*

El análisis discriminatorio agrupó a las cepas en cuatro grupos diferentes. Las muestras que conforman cada grupo provienen de sitios geográficos diferentes, de acuerdo al origen obtenido del historial clínico del paciente, por lo que no existe una asociación entre muestras. El grupo donde se asociaron un mayor número de muestras ($n = 20$) fue el Grupo I, mientras que el Grupo IV solo se registra una cepa (CiNL01) (Tabla III, Fig. 4). Es importante resaltar que en el Grupo I se agruparon todas las muestras clasificadas como Baja California (CiBC), con excepción de la cepa CiBC01.

Tabla III. Descripción de los grupos formados (I - IV) para las cepas de *C. immitis* de acuerdo al Análisis Discriminatorio con el programa Statistica v7.0.

Grupos			
I	II	III	IV
CISON 01	CiGRO01	CiEU01	CiNL01
CISON 02	CiBC01	CiEU02	
CiCOA01	CiMIC02		
CiCHI02	CiMIC03		
CiCHI03			
CiMIC01			
CiBC02			
CiEM01			
CiBC03			
CiBC04			
CiCOA02			
CiND01			
CiBC05			
CiND02			
CiBC06			
CiBC07			
CiBC09			
CiBC10			
CiBC11			
CiBC08			

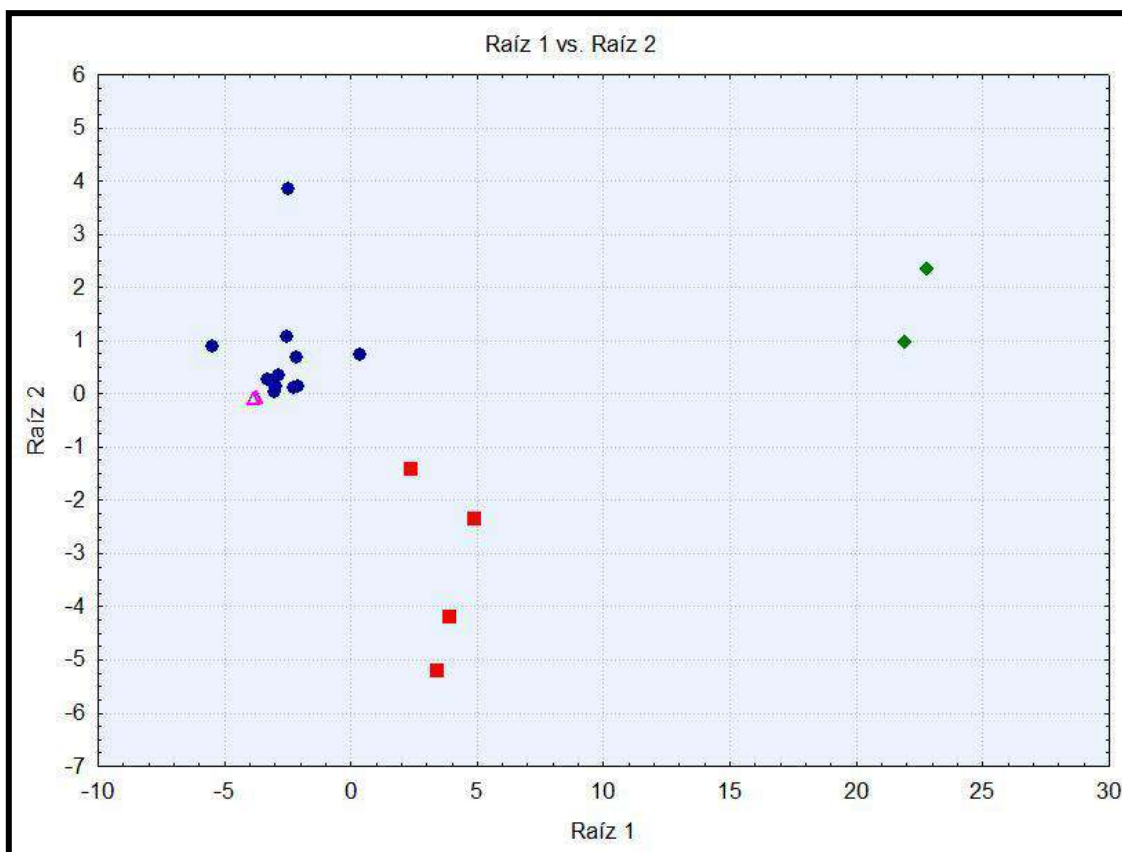


Figura 4. Distribución por coordenadas de *C. immitis* producto del análisis discriminador con el programa Statistica v7.0 utilizando 28 cepas de este estudio. Cada punto representa un individuo y los colores representan los grupos formados. Azul – Grupo I, Rojo – Grupo II, Verde–Grupo III y Rosa – Grupo IV.

5.4.2 Análisis genético de *C. posadasii*

El número total de alelos detectados por locus varió de 1.0 (GAC2 y 621.2) a 12 (KO1 y KO3) (Apéndice 3). La riqueza alélica varió de 1.0 en GAC2 y 621.2 a 4.8 en KO3. Se detectaron alelos privados en la mayoría de los loci con excepción del GAC2, ACJ y 621.2. El locus con mayor número de alelos privados fue el KO3 (6) (Tabla IV, Apéndice 4).

Tabla IV. Número de alelos, riqueza alélica y alelos privados determinados en el presente estudio para *C. posadasii*.

Locus	Número de alelos	Riqueza alélica	Alelos privados
KO9	8	2.2	3
621.2	1	1.0	0
GA37	11	2.6	2
ACJ	2	1.1	0
KO7	7	1.9	3
KO1	12	2.6	4
GAC2	1	1.0	0
KO3	12	2.6	6
TOTAL	54	1.9	18

El número total de genotipos fue de 95 de los cuales 79 fueron únicos y 16 redundantes. La mayor parte de los genotipos redundantes están constituidos por cepas de sitios geográficos diferentes. Sin embargo, los genotipos 9 y 15, están constituidos por un solo sitio geográfico, de Nuevo León (CpNL) y Coahuila (CpCO), respectivamente. Un aspecto interesante, es que los genotipos 1 – 3, están constituidos por la combinación de cepas provenientes de Sinaloa y Chihuahua (Tabla V). La probabilidad de identidad estimada para observar genotipos idénticos multilocus entre dos individuos muestreados a partir de una población (P_i) fue de 1/100, la cual es similar a la de *C. immitis*.

Tabla V. Muestras con genotipo redundante de *Coccidioides posadasii* obtenidos en este estudio mediante el programa MS Tools v3.1.1.

Genotipo	Nombre de cepa
1	CpSIN01, CpCHI01
2	CpSIN07, CpCHI03
3	CpSINO8, CpCHI08
4	CpCHI11, CpCHI16
5	CpND07, CpND08
6	CpNL19, CpCOA19
7	CpSIN05, CpCHI02, CpCOA15, CpND05, CpBC02
8	CpMIC04, CpMIC05, CpCEN03
9	CpNL21, CpNL22, CpNL23
10	CpSIN06, CpMIC01
11	CpCOA17, CpCOA09
12	CpND09, CpND12,
13	CpNL01, CpNL16, CpNL17, CpTAM05 CpSIN03 CpCOA04, CpCOA20, CpCOA31, CpCOA35
14	CpNL11, CpBC07
15	CpCOA02, CpCOA23, CpCOA28, CpCOA32 CpCOA11
16	CpCOA17, CpCHI13

5.4.3 Distribución geográfica de *C. posadasii*

El análisis discriminatorio tomando como referencia el origen geográfico de cada cepa de acuerdo al historial clínico, mostró siete grupos, apreciándose un comportamiento general similar al de *C. immitis*, en donde cada grupo está constituido por cepas de diferentes regiones geográficas. El grupo que mostró mayor número de muestras fue el IV y V ($n = 84$ y $n = 20$, respectivamente). Mientras que el grupo I y III solo presentaron dos muestras cada uno. Es importante resaltar que el grupo IV se caracteriza por contener la mayor parte de las cepas de Nuevo León (CpNL, 16 de 24 cepas) y Coahuila (CpCO, 29 de 35 cepas) (Tabla VI, Figura 5).

El análisis de comparaciones pareadas de frecuencias alélicas (F_{ST}) entre Grupo IV y V, los cuales mostraron el mayor número de muestras, mostró un valor 0.04513 ($P < 0.006$, corrección de Bonferroni), lo que indica que ambos grupos son genéticamente diferentes, aún cuando presentan muestras del mismo sitio geográfico.

Tabla VI. Descripción de los grupos formados (I -VII) de acuerdo al Análisis Discriminante realizado con el programa Statistica v7 utilizando muestras de *C. posadasii*.

GRUPOS							
I	II	III	IV	IV	V	VI	VII
CpSIN06	CpCEN01	CpCOA03	CpNL01	CpCHI15	CpNL04	CpSIN01	CpNL09
CpMIC01	CpMIC04	CpCOA06	CpNL02	CpTAM03	CpNL07	CpCHI01	CpSIN09
	CpMIC05		CpNL03	CpCHI16	CpNL10	CpCOA01	CpSIN10
	CpCEN03		CpNL06	CpTAM04	CpNL12	CpSIN04	CpCOA10
			CpNL08	CpCOA37	CpNL13	CpBC03	CpND13
			CpNL11	CpBC05	CpNL20		
			CpNL14	CpBC07	CpNL24		
			CpNL15	CpND02	CpNL26		
			CpNL16	CpND03	CpTAM05		
			CpNL17	CpCOA13	CpCHI04		
			CpNL18	CpCOA15	CpTAM01		
			CpNL19	CpCOA16	CpBC01		
			CpNL21	CpCOA17	CpCEN05		
			CpNL22	CpCOA18	CpCOA14		
			CpNL23	CpCOA19	CpCOA33		
			CpNL25	CpCOA20	CpND10		
			CpSIN02	CpCOA08	CpND11		
			CpSIN05	CpCOA21	CpCEN06		
			CpSIN03	CpCOA22	CpND04		
			CpCHI02	CpCOA23	CpBC04		
			CpCOA02	CpCOA24			
			CpSIN07	CpCOA25			
			CpCHI03	CpCOA26			
			CpCHI05	CpCOA27			
			CpCHI06	CpCOA28			
			CpCOA04	CpCOA29			
			CpND01	CpCOA30			
			CpSIN08	CpCOA09			
			CpCHI07	CpCOA31			
			CpCHI08	CpCOA32			
			CpCHI09	CpND05			
			CpCHI10	CpND06			
			CpTAM02	CpBC02			
			CpCHI11	CpND07			
			CpCOA05	CpND08			
			CpMIC02	CpND09			
			CpCHI12	CpCOA34			
			CpMIC03	CpCOA35			
			CpCHI13	CpCOA11			
			CpCHI14	CpCOA36			
			CpCOA07	CpND12			
			CpCEN02	CpCOA12			

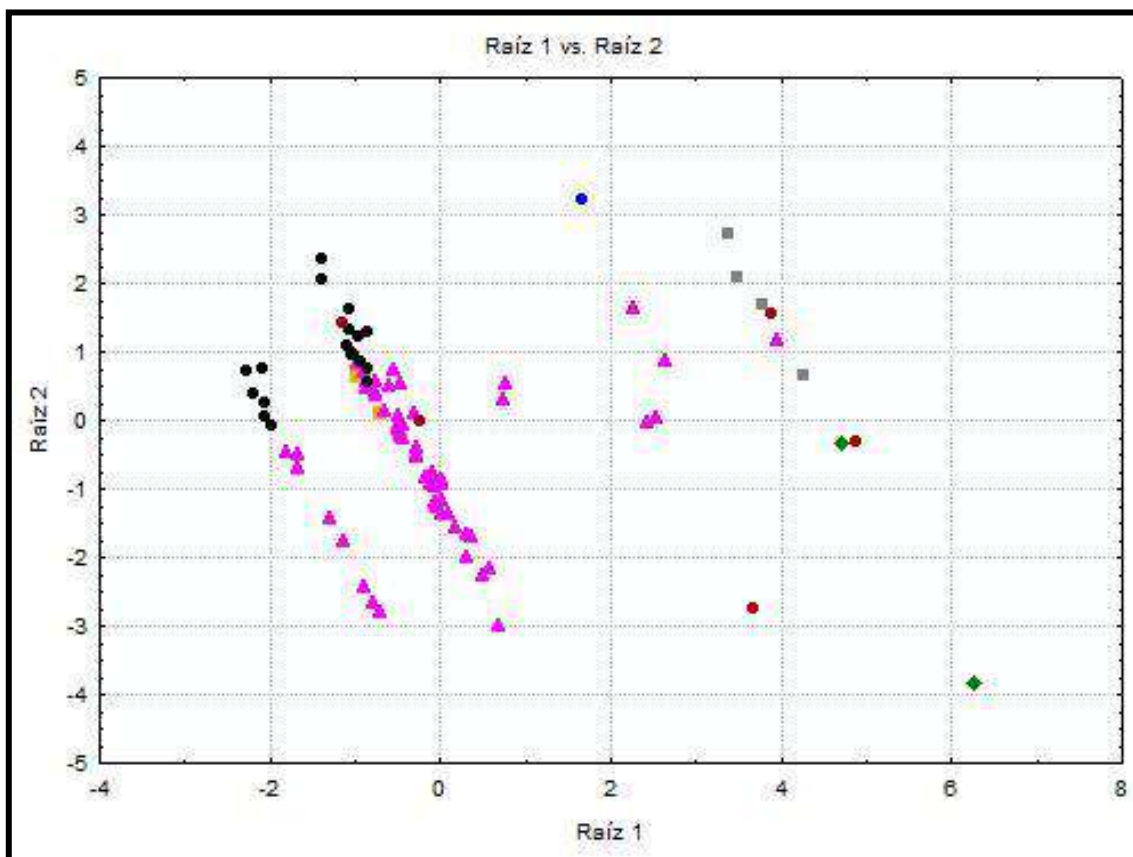


Figura 5. Distribución por coordenadas de *C. posadasii* producto del Análisis Discriminatorio con el programa Statistica v7.0 utilizando 28 cepas de este estudio. Cada punto representa un individuo y los colores representan los grupos formados. Azul – Grupo I, Naranja – Grupo II, Verde – Grupo III, Rosa–Grupo IV, Negro- Grupo V, Gris- Grupo VI y Café- Grupo VII.

5.4.4 Distribución geográfica de *C. immitis* y *C. posadasii* por áreas geográficas.

El análisis discriminatorio tomando como referencia el área geográfica (Noreste = NE, Noroeste = NO, Centro = CEN y ND = No datos) y combinando las cepas de *C. immitis* y *C. posadasii*, mostró tres principales grupos en donde se separan claramente ambas especies. Para *C. posadasii* se observan dos grupos, uno perteneciente a la región NO y otro a la NE (Figura 6). Mientras que para *C. immitis*, se forma un grupo perteneciente a la región NO.

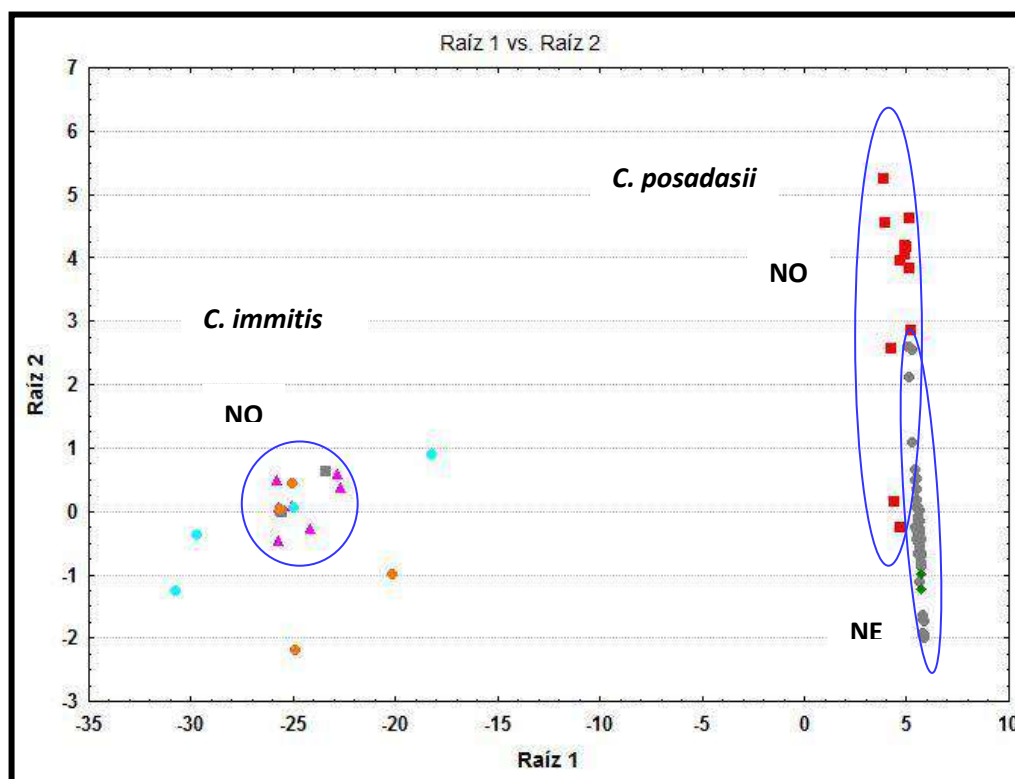


Figura 6. Distribución por coordenadas de *C. immitis* y *C. posadasii* producto del Análisis Discriminatorio con el programa Statistica v7.0 utilizando 7 regiones geográficas, donde cada punto representa un individuo y los colores representan los grupos formados. Gris – NE, Rojo – NO, Verde – CEN, Rosa – iNO, Aqua – iCEN, Gris – iNE y Naranja – iND.

En la tabla de asignación, se aprecia un alto porcentaje de asignación para las cepas de *C. posadasii*, principalmente las de la región NE y NO mientras que para *C. immitis* el mayor porcentaje de asignación lo tiene la región NO (Tabla VII).

Tabla VII. Porcentajes de asignación por región. La línea horizontal superior indica la región asignada donde las tres primeras regiones corresponden a *C. posadasii* (pNE, pNO, pCEN) y las últimas cuatro a *C. immitis* (iNO, iCEN, iNE, iND), la primera columna muestra la región origen y las columnas representan el porcentaje de asignación.

	%	pNE	pNO	pCEN	iNO	iCEN	iNE	iND
pNE	94.2	98	6	0	0	0	0	0
pNO	85.7	2	12	0	0	0	0	0
pCEN	75.0	1	0	3	0	0	0	0
iNO	86.7	0	0	0	13	1	1	0
iCEN	40.0	0	0	0	2	2	0	1
iNE	33.3	0	0	0	2	0	1	0
iND	50.0	0	0	0	2	0	0	2
Total	87.9	101	18	3	19	3	2	3

5.4.5 Análisis genético de acuerdo a la forma clínica

La asociación entre el genotipo de las cepas y la forma clínica de presentación en el paciente fue evaluada mediante el cálculo de F_{ST} pareado, el cual no mostró diferencias significativas para ninguna de las combinaciones realizadas ($P > 0.006$) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Matriz de comparaciones pareadas de los valores de F_{ST} de *Coccidioides spp.* entre cinco grupos diferentes formados a partir de la forma clínica de presentación, utilizando muestras obtenidas en este estudio. Grupos: 1 (Cutánea), 2 (Diseminada Cutánea), 3 (Diseminada Inespecífica), 4 (Diseminada Neurológica), 5 (Pulmonar).

	GRUPOS				
	1	2	3	4	5
1	0.000				
2	0.000	0.000			
3	0.000	0.000	0.000		
4	0.000	0.000	0.000	0.000	
5	0.000	0.040	0.001	0.000	0.000

Ningún valor es significativamente diferente ($P < 0.006$; corrección de Bonferroni)

El análisis discriminador generó tres grupos (Tabla IX, Fig. 7), siendo el grupo I el que mostró mayor número de muestras ($n = 48$) y fue el más heterogéneo, incluyendo los cuatro tipos de forma clínica de presentación. El grupo II ($n = 11$), se caracterizó por presentar exclusivamente cepas que generaron afección pulmonar (PULM). El grupo III solo mostró una cepa.

Un aspecto importante de resaltar es que las cepas de *C. immitis* se caracterizaron por presentar la forma clínica diseminada cutánea (DIS CUT), con excepción de una cepa que mostró forma pulmonar (PULM14). Mientras que las de *C. posadasii* presentaron todos los tipos de forma clínica.

Tabla IX. Descripción de los grupos formados (I - III) para las cepas de *Coccidioides. sp.* de acuerdo al Análisis Discriminatorio realizado con el programa Statistica v7 (StatSoft 2004). Diseminada Cutánea (DIS CUT), Diseminada Inespecífica (DIS INESP), Diseminada Neurológica (DIS NEUR), Cutánea (CUT), Pulmonar (PULM). Se marcan en **negrita** e *Itálica* las cepas de *C. immitis*, el resto pertenecen a *C. posadasii*.

GRUPOS			
I	I	II	III
CUT01	DIS CUT 24	PULM 03	<i>PULM 14</i>
CUT02	DIS CUT 25	PULM 04	
DIS CUT 01	DIS CUT 26	PULM 05	
DIS CUT 02	DIS CUT 27	PULM 06	
DIS CUT 03	DIS CUT 28	PULM 07	
DIS CUT 04	DIS CUT 29	PULM 08	
DIS CUT 05	DIS CUT 30	PULM 09	
DIS CUT 06	<i>DIS CUT 31</i>	PULM 10	
DIS CUT 07	DIS CUT 32	PULM 11	
<i>DIS CUT 08</i>	<i>DIS CUT 33</i>	PULM 12	
<i>DIS CUT 09</i>	DIS CUT 34	PULM 13	
DIS CUT 10	DIS CUT 35		
DIS CUT 12	<i>DIS CUT 36</i>		
<i>DIS CUT 13</i>	DIS CUT 37		
DIS CUT 14	DIS CUT 38		
DIS CUT 15	DIS INESP 01		
<i>DIS CUT 16</i>	DIS INESP 02		
DIS CUT 17	DIS INESP 03		
<i>DIS CUT 18</i>	DIS NEUR 01		
<i>DIS CUT 19</i>	DIS NEUR 02		
DIS CUT 20	DIS NEUR 03		
<i>DIS CUT 21</i>	DIS NEUR 05		
DIS CUT 22	PULM 01		
DIS CUT 23	<i>PULM 02</i>		

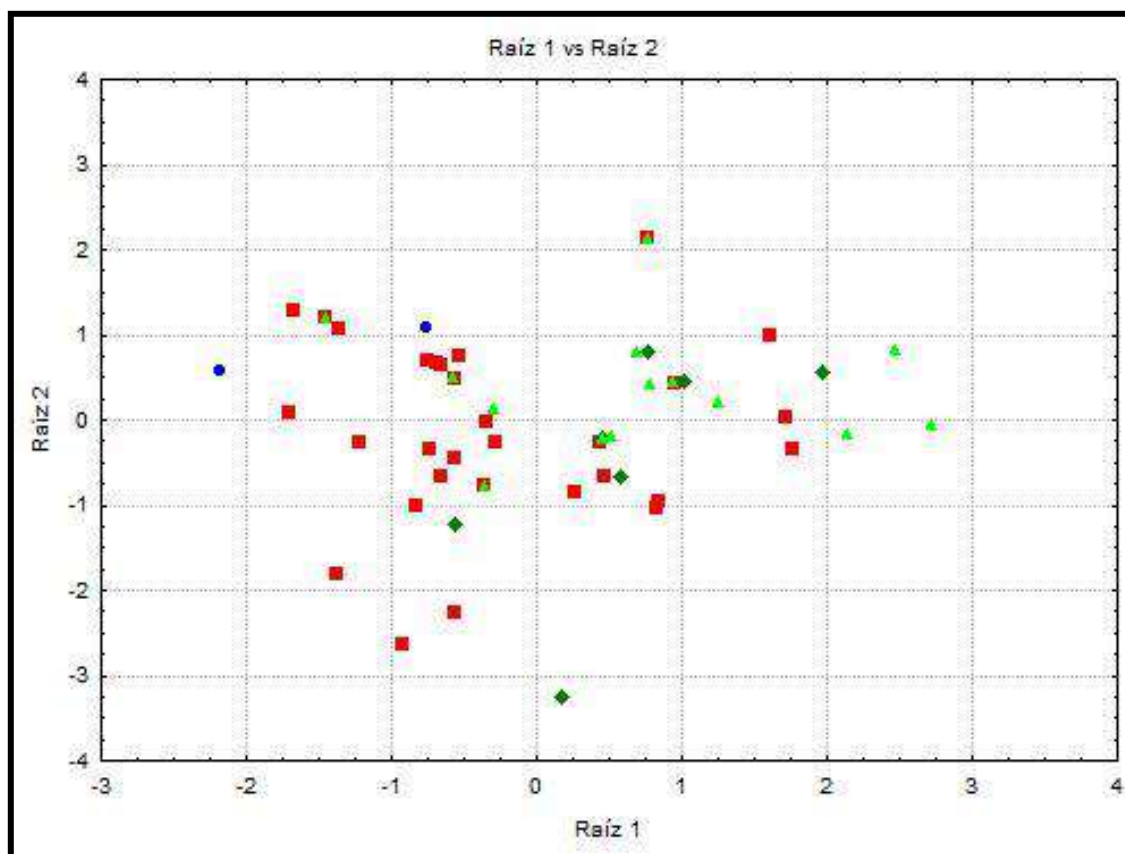
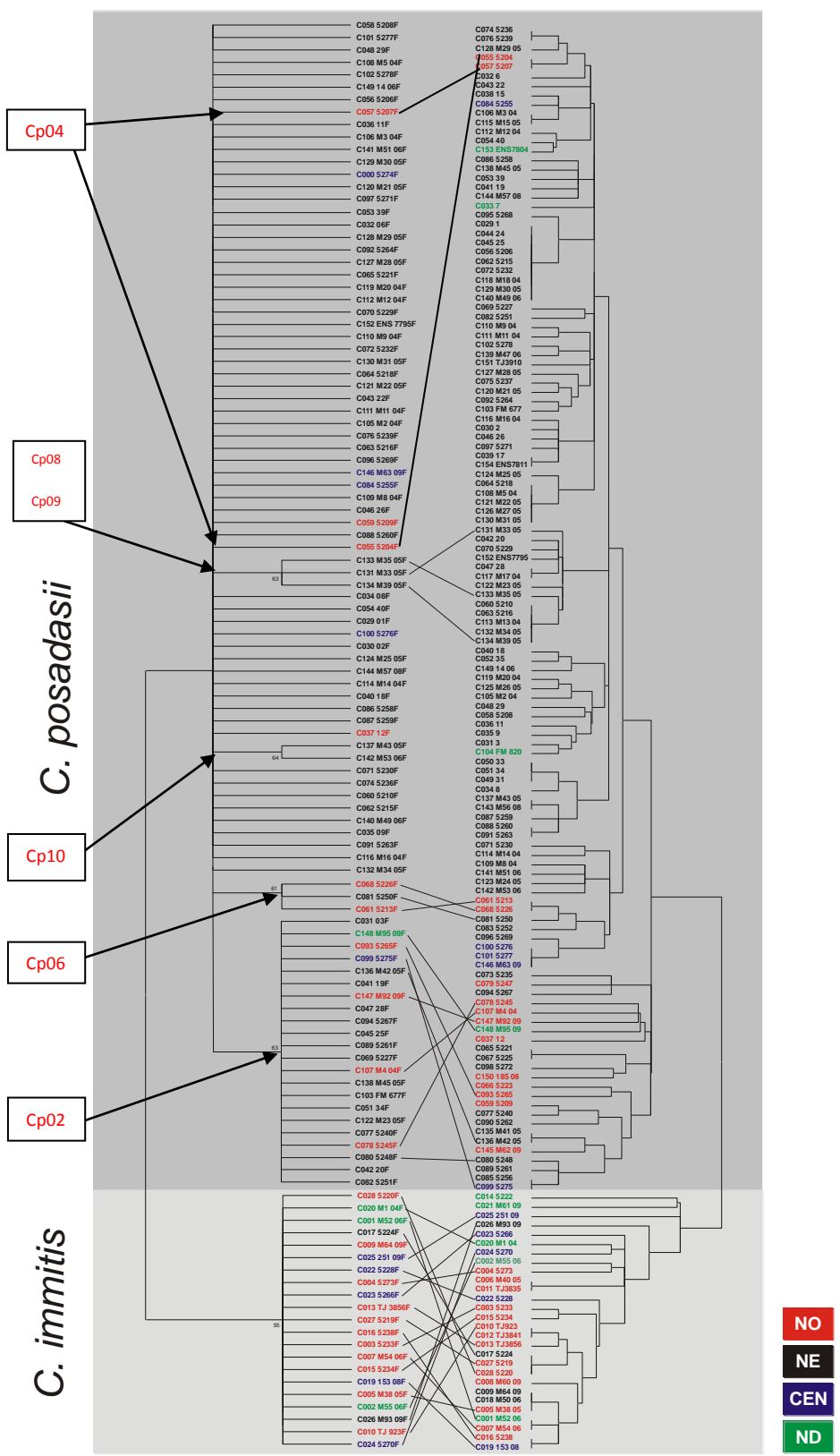


Figura 7. Distribución de *Coccidioides spp.* por la forma clínica de presentación producto del análisis discriminante con el programa Statistica v7.0, agrupadas con cepas de este estudio. Azul- CUT, Rojo- DIS CUT, Verde- DIS INESP, Verde Claro- PULM.

5.4.6 Relación Genética

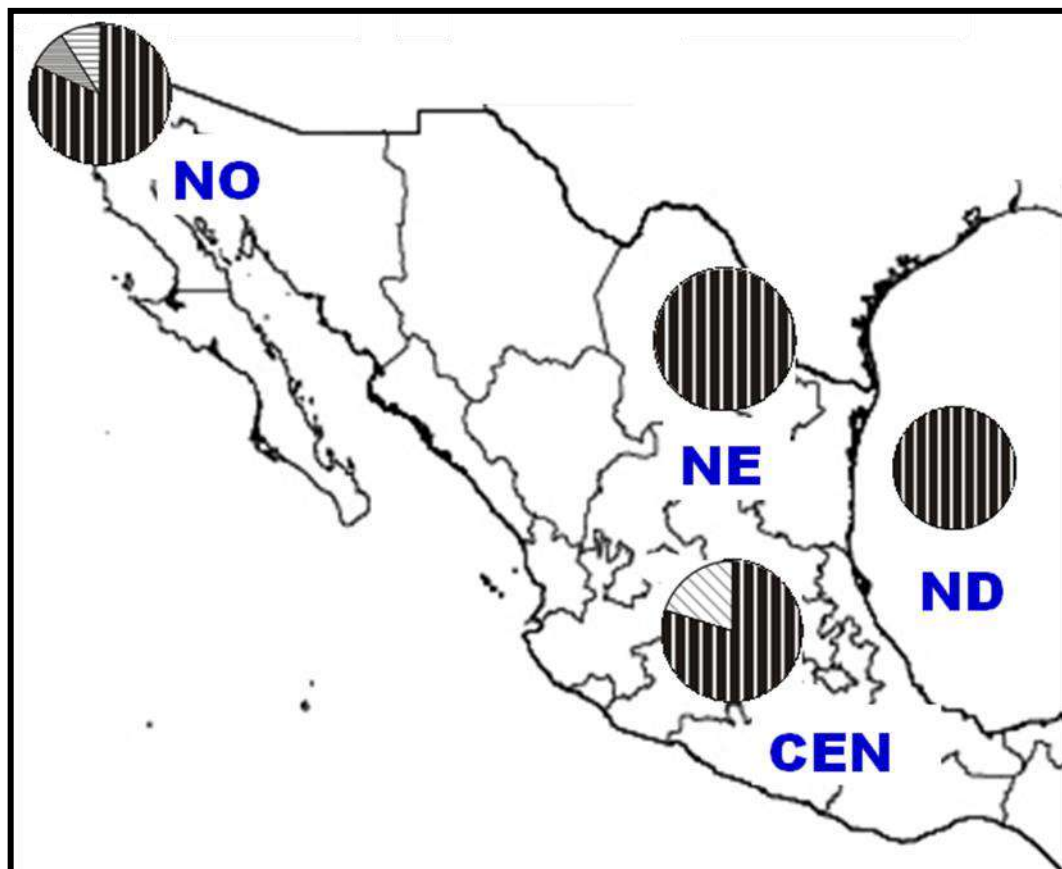
El árbol genético combinando las secuencias de la región 18S y Ag2/PRA y el generado con los datos de microsatélites (Figura 8), muestran dos clados principales, uno perteneciente a las cepas de *C. immitis* y otro para las cepas de *C. posadasii*. En el clado de *C. immitis*, no se observa estructura, sin embargo, las cepas de la región NO se encuentran más relacionadas entre si.. Por otro lado, en el clado de *C. posadasii*, se observa una mejor separación entre las cepas de la región NO de la del NE. Otro aspecto importante, es que para *C. posadasii*, el haplotipo 2 y 6 se ubican dentro del clado NO y los haplotipos 8, 9 y 10 en el clado NE. El haplotipo 4 corresponde a la región NO específicamente de Sinaloa (Figura 8 – 10)

Figura 8. Árbol genético generado a partir de la combinación de las secuencias de la región 18S y AG2/ARP. En el fenograma del apéndice 5, se muestra como las cepas pertenecientes a *C. immitis* y las de *C. posadasii*, son separadas perfectamente tanto para microsatélites (Derecha) como para las secuencias de 18S+Ag2 (Izquierda). También se puede observar como las correspondientes al Noroeste (NO) se agrupan en su mayoría en la parte inferior del árbol y se aprecian en color rojo, mientras que las del noreste se ubican en la parte superior del mismo y se aprecian en color negro. Se pueden identificar como algunas de las cepas agrupadas en algunos de los genotipos, también comparten rama en algunos de los microsatélites. Con esta agrupación se puede ver que el haplotipo 2 y 6 de *posadasii* se encuentran en el noroeste y el 8, 9 y 10 en el noreste.



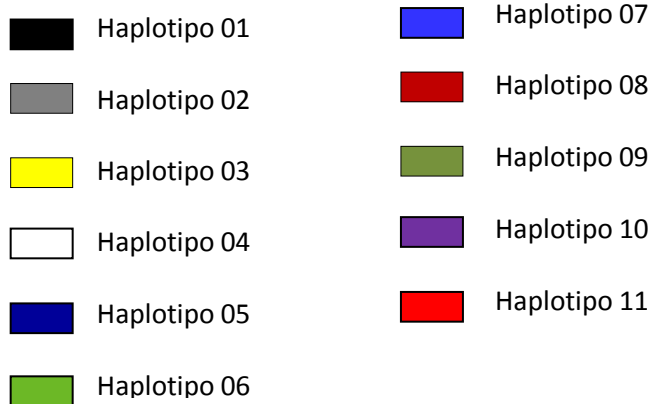
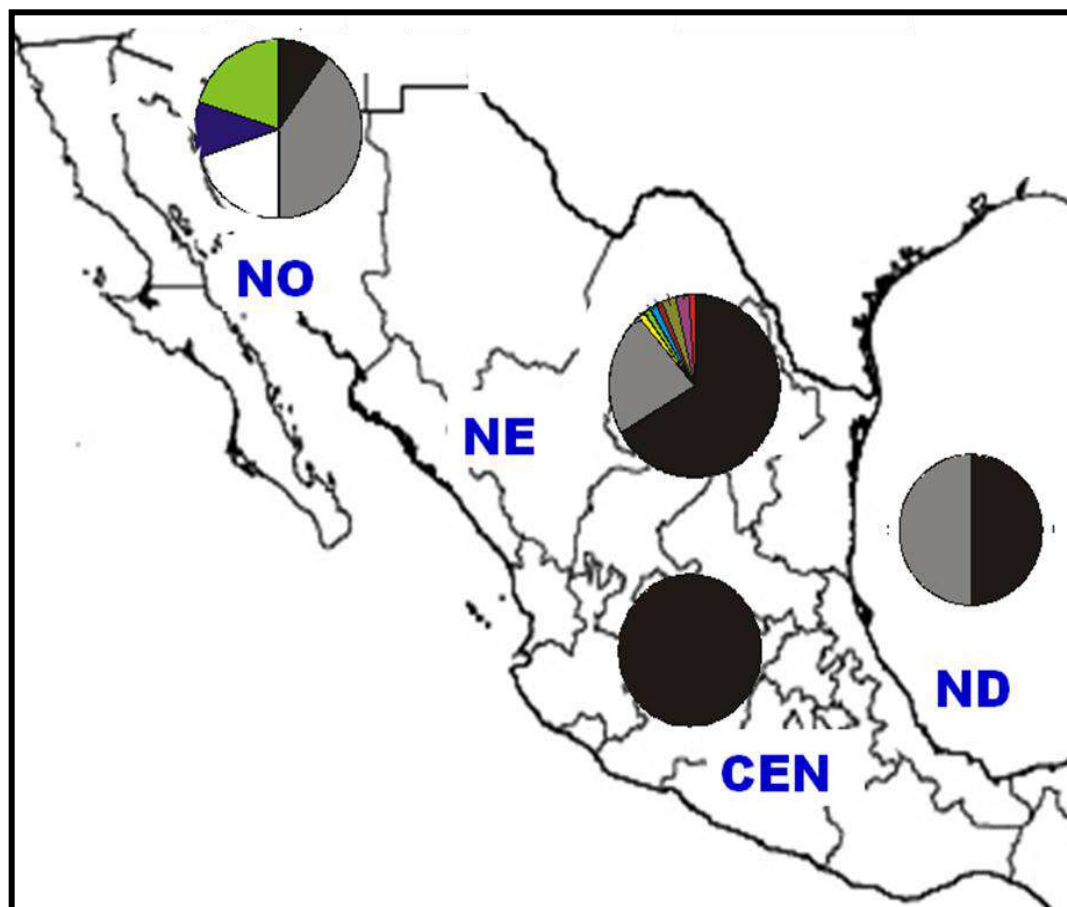
18S + Ag2 Microsatélites

Figura 9. Distribución de haplotipos obtenidos de la combinación de secuencias de 18S y Ag2/ARP por regiones para la especie de *C. immitis*. NO = noroeste, NE = noreste, CEN = centro, ND = no datos.



-  Haplotipo 01
-  Haplotipo 02
-  Haplotipo 03
-  Haplotipo 04

Figura 10. Distribución de haplotipos obtenidos de la combinación de secuencias de 18S y Ag2/ARP por regiones para la especie de *C. posadasii*. NO = noroeste, NE = noreste, CEN = centro, ND = no datos.



6. DISCUSIÓN

6.1 Identificación molecular de especie de *Coccidioides*

Las muestras de cepas fueron identificadas como *C. immitis* y *C. posadasii* amplificando tres diferentes regiones de DNA: 1) 18S ribosomal, 2) Antígeno rico en Prolina Ag2/ARP y 3) locus de microsatélite 621.2. Todas las muestras de cepas amplificadas con las tres diferentes regiones dieron los mismos resultados de especie, con excepción de 5 muestras (CiBC01, CiCHI02, CiBC06, CiEU02 y CiBC09). Estas muestras fueron identificadas como *C. immitis* con el gen Ag2/ARP y con el locus 621.2 y como *C. posadasii* con la región 18S ribosomal. Para descartar cualquier posibilidad de error en la amplificación, se repitió la extracción de DNA una vez más y se realizó la amplificación de las tres regiones dos veces más, obteniéndose los mismos fragmentos de amplificación. Este resultado sugiere la posibilidad de que esté ocurriendo reproducción sexual la cual se expresa con datos de hibridación e introgresión. La introgresión, definida como el intercambio de genes entre especies mediante hibridación y el subsiguiente retrocruzamiento con una especie parental (Rieseberg 1998), lo que se traduce en la infiltración de fragmentos del genoma de una especie en otra. Esta posibilidad ya fue considerada por otros autores, entre ellos Burt (1996), quien concluye después de analizar varias regiones de este hongo en su trabajo, que el sexo biparental es una parte regular del ciclo de vida de *Coccidioides*. Por su parte, Mandel (2007) menciona que un criterio necesario aunque no suficiente para que

ocurra reproducción sexual en hongos es la presencia de genes de apareamiento. Algunos estudios han identificado dichos genes en hongos ascomicetos (Coppin 1997). Este dato es importante debido a que los hongos se caracterizan por presentar reproducción asexual principalmente (Mandel 2007).

El análisis de la región Ag2/ARP mostró diferencias suficientes en la secuencia de nucleótidos que permite diferenciar a *C. immitis* de *C. posadasii*. Este resultado difiere con lo reportado por (Bialek et al. 2004) y (Cordeiro et al. 2007), quienes mencionan que la proteína amplificada es única para *C. immitis* cepa Silveira ahora conocida como *C. posadasii*, sin embargo coincide con lo reportado por (Peng 1999) quien secuenció 3823 pb de esta región (No. de Acceso AF013256) y que permite diferenciar ambas especies. La diferencia mostrada con otros autores puede deberse a que en sus trabajos incluyeron únicamente cepas de *C. posadasii* mientras que en el presente trabajo se incluyeron ambas especies.

6.3 Análisis genético poblacional

El número de genotipos redundantes observados tanto para *C. immitis* como para *C. posadasii* permite establecer básicamente dos situaciones

probables; la primera que el número de loci de microsatélites debe ser incrementado para tener una mayor resolución y diferenciación de los individuos (cepas) y segundo que el tipo de reproducción asexual predominante nos permite observar copias que evitará que el incremento de loci analizados nos aporte mayor información.

Es importante mencionar que las únicas cepas que cuentan con origen geográfico preciso por ser aisladas de suelo de Coahuila están etiquetadas como CpCOAH34, CpCOAH35 y CPCOAH36, de estas solamente la cepa CpCOAH35 (*C. posadasii*), cuenta con genotipos redundantes de los cuales tres corresponden a Coahuila y tres provienen de Nuevo León, mismas que es muy probable provengan también de Coahuila. Esto es debido a que por comunicación personal con investigadores que proporcionaron las cepas, mencionan que la mayor parte de las cepas analizadas en Monterrey, Nuevo León son enviadas de Instituciones de Coahuila. La cepa CpSIN02 identificada molecularmente como *C. posadasii*, puede ubicarse geográficamente en Sinaloa, ya que se aisló de un perro y aun considerando que el historial no da más información, es poco probable que este se haya desplazado a otras regiones. Sin embargo, esta cepa no cuenta con genotipos redundantes, ni se asocia con ninguna cepa de otra región geográfica, lo que hace suponer que efectivamente pertenece a este sitio. Por otra parte, la cepa CiEDMEX01, identificada como *C. immitis*, proveniente de un paciente originario del Estado de México, que de acuerdo al historial clínico, el paciente jamás salió de dicho

lugar, sin embargo, cuenta con un genotipo redundante en el estado de Chihuahua (CiCHI03) y se asemeja a dos genotipos del estado de Baja California (CiBC08 y CiBC10), con diferencia en un solo alelo en el locus KO9. Por tal motivo, es muy probable que dichas cepas provengan de forma directa o indirecta de la zona conocida endémica para *C. immitis* y con ello la veracidad de la información con respecto al origen proporcionado en el historial clínico del paciente para esta cepa queda en duda. El hecho de encontrar genotipos similares en diferentes agrupaciones, hace suponer que es posible que la distribución de los mismos no cuenta con barreras que limiten su dispersión, dichas barreras que aunque no son visibles es probable estén limitando la dispersión de *C. immitis* mas que de *C. posadasii*.

El análisis de agrupamiento utilizando un método multivariado (Análisis discriminante) genera cuatro grupos para *C. immitis* y siete para *C. posadasii*, este análisis permite transformar variables independientes en variables dependientes formando grupos de menor dimensión. El análisis bayesiano con el que se buscó agrupar de inicio no fue incluido en este estudio debido a que el programa de computación (Pritchard et al. 2000) que lo implementa no está adaptado para analizar datos haploides, como es el caso de *Coccidioides*. El análisis de asignación de individuos (cepas) en grupos, no mostró relación con el origen geográfico de los individuos de un mismo grupo de acuerdo con los datos clínicos obtenidos. Esta situación puede deberse a que la información clínica no se encontraba completa, ya sea porque la persona que tomó los

datos omitió información o bien que el paciente no se la proporcionó. El 10 % de las cepas no contó con ningún tipo de antecedentes clínicos relacionados con su origen. La conformación de grupos se dificultó debido a que los valores de asignación para cada individuo se asemejaban y en ocasiones llegaban a ser exactamente los mismos.

La relación existente entre las diferentes cepas de *Coccidioides* son confirmados por la frecuencia de los haplotipos, la distribución de las cepas en el árbol y el análisis discriminador, donde se puede inferir que *C. immitis* parece estar más restringido a su territorio que *C. posadasii*. Por ejemplo para *C. immitis*, la mayor diversidad haplotípica se encuentra en la región noroeste (3 haplotipos) de los cuales uno de ellos, el haplotipo 5 (Ci05) se encontró únicamente en esta región geográfica. De la misma forma para *C. posadasii* la mayor diversidad haplotípica se encuentra en la región noreste que cuenta con 9 de los 11 haplotipos encontrados en la especie, siendo el más frecuente el haplotipo 1 (Cp01) que también se encuentra en la región NO, pero en menor frecuencia. El haplotipo 5 (Cp05) es exclusivo de la región NO aunque no es el predominante lo que hace pensar que este haplotipo se encuentra en la región límite del sitio origen para esta especie en la región NE.

Los valores bajos (< 50%) de repeticiones (bootstrap) obtenidos en gran parte de las ramas del fenograma son un reflejo de la baja diferenciación genética existente entre los individuos analizados.

Con respecto a la posible asociación entre el genotipo de las cepas y la forma clínica de presentación, los valores pareados de F_{ST} permiten observar que no existen diferencias que establezcan la mayor o menor agresividad de algún genotipo obtenido con el análisis de microsatélites, sin embargo el análisis discriminatorio muestra una tendencia a separar las cepas que causaron diseminación cutánea (Grupo I) y los de afección pulmonar (Grupo II). También se observa que las cepas de *C. immitis* tienden a agruparse en las que causan diseminación cutánea pese a que no todas las cepas diseminantes corresponden a esta especie. Por lo anterior, puede decirse que del total de cepas de *C. immitis* analizadas, el 92% causaron diseminación fuera de pulmones, mientras que para *C. posadasii* lo hicieron el 70%. Esta situación nos permite suponer que si bien el genotipo por si solo no es suficiente para establecer la relación genotipo-patogenicidad, si permite establecer que la infección con *C. immitis* tiene mayor probabilidad de diseminar a otros órganos, principalmente a piel. Los datos generales obtenidos concuerdan con lo reportado por (Fisher et al. 2000) y (Jewell et al. 2008), donde en sus respectivos estudios consideraron la posibilidad de que algunos brotes en Estados Unidos tuvieran relación con la presencia de cepas hipervirulentas de *Coccidioides*, aunque finalmente concluyeron que el incremento en el número

de casos, tiene mayor relación con factores ambientales y del individuo que con el perfil genético del hongo.

El hecho de inferir ubicaciones geográficas para cada genotipo sin contar con análisis de suelo de las diferentes regiones contempladas en este estudio nos obliga a considerar esta posibilidad para trabajos futuros donde el análisis de otras regiones del genoma de este patógeno se estarían evaluando.

7. CONCLUSIONES

- Las secuencias de 18S ribosomal, Ag2/PRA y locus de microsatélite 621.2 son útiles para la identificación molecular por especie de *Coccidioides*.
- Las secuencias de 18S ribosomal, Ag2/PRA no aportan información suficiente para ser utilizadas como marcadores individuales en análisis de genética poblacional.
- La especie de *C. immitis* no presentó una estructura definida, sin embargo, la mayor parte de las cepas pertenecen a la región NO.
- La especie de *C. posadasii* mostró una estructura definida separándose las cepas ubicadas en la región NO y NE.
- El origen de las cepas analizadas no se puede establecer con precisión si no se cuenta con análisis de tierra que establezca un punto de partida para el resto de los genotipos.
- Todas las cepas de *Coccidioides immitis* provienen de la misma región geográfica, es decir de California en Estados Unidos y Baja California en México.

- Las diferencias mostradas en algunas cepas con los distintos marcadores empleados exponen la posibilidad de que esté ocurriendo reproducción sexual.

8. LITERATURA CITADA

- Baptista-Rosas RC (2008) Environmental search for *Coccidioides spp.* in soil samples of endemic areas from Baja California. In: Proceedings-52th Coccidioidmycosis study group, pp.
- Baptista-Rosas RC, Riquelme M (2007) Epidemiología de la Coccidioidomycosis en México. Rev Iberoam Micol 24, 100-005.
- Bart-Delabesse E HJ (1998) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. Journal of Clinical Microbiology 36, 2413-2418.
- Batra P (1992) Pulmonary coccidioidomycosis. J Thorac Imaging 7, 29-38.
- Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Ceceñas L, Reischl U, González GM (2004) PCR Assays for Identification of *Coccidioides posadasii* Based on the Nucleotide Sequence of the Antigen 2/Proline-Rich Antigen. Journal of Clinical Microbiology 42, 778-783
- Bonferroni CE (1936) Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilit `a. . Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8, 3--62.
- Buckley M (2008) American Academy of Microbiology, The fungal kindom. Diverse and essential roles in earth's ecosystem.
- Burgueño-Duarte V (1997) Aislamiento de *Coccidioides immitis* en muestras de pacientes con diagnostico presuntivo de tuberculosis pulmonar en la ciudad de Tijuana, Baja California., Universidad Autónoma de Baja California.
- Burt A BMD, G. L. Koenig, D. A. Carter, T. J. White, and J. W. Taylor. (1997) Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. Mol. Ecol. 6.

- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW (1995) A safe method of extracting DNA from *Coccidioides immitis*. Fungl Genet Newsletter 42, 23.
- Canteros C, Toranzo A, Suárez-Alvarez R, Davel G, Castañon-Olivares L, Nápoli J (2009) Genetic characterization of the fungus involved in the first case of coccidioidomycosis described by Alejandro Posadas in 1892. Medicina (Buenos Aires) 69, 215-220.
- Castañeda-Godoy R, Laniado-Laborin R (2002) Coexistencia de TB y coccidioidomycosis. Presentacion de dos casos clínicos. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 15, 98-101.
- Castañon L, Guereña-Elizalde D, Gonzalez-Martinez R, Gonzalez-Gonzalez G, Licea-Navarro A, Aroch-Calderon A (2007) Molecular identification of *Coccidioides* isolates from mexican patients. Annals of the New York academy of sciences.
- Castañón Olivares LRAC, Arturo; Bazán Mora, Elva; Córdova Martínez, Erika (2004) Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM 47, 144-148.
- CDC (2001) Public health dispatch: Coccidioidomycosis.- among persons attending the Worl Championshipo of model Airplane Flyng.- Kern County. In: Proceedings-MMWR Morb Mortal Wkly Rep 50, pp. 1106-1107.
- Codon Code Corporation (2006) *Codon Code Aligner*
<http://www.codoncode.com/index.htm>.
- Collins CH, Grange JM (1999) Tuberculosis acquired in laboratories and necropsy rooms. Communicable Disease and Public Health 2.
- Coppin E, Robert; Sylvie Arnaise, Picard AM (1997) Mating Types and Sexual Development in Filamentous Ascomycetes. Microbiology And Molecular Biology Reviews 61, 411-428.

- Cordeiro RdA, Brilhante RSN, Rocha MFG, Moura FEA, Camargo ZPd, Sidrim JJC (2007) Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 449-451.
- Chiller TM, Galgiani JN, Stevens DA (2003) Coccidioidomycosis. *Infec Dis Clin North Am* 17, 41-57.
- Dixon DM (2001) *Coccidioides immitis* as a Select Agent of bioterrorism. *Journal of Applied Microbiology* 91, 602-605.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479 - 491.
- Fisher M, Koenig G, White T, Taylor J (2000) Pathogenic clones versus environmentally driven population increase: Analysis of an epidemic of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbio* 38, 807-813.
- Fisher M, Koenig G, White T, Tay J (2002) Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94, 73-84.
- Fisher MC, White TJ, Taylor JW (1999) Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular Ecology* 8, 1082-1084.
- Galgiani J (1999) Coccidioidomycosis: A Regional Disease of National Importance: Rethinking Approaches for Control. *Ann Intern Med* 130, 293-300.
- Goudet J (2001) *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*: Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie Université de Lausanne. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, Switzerland.

- Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor J (2000) Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 92, 406-410.
- Guarro JJ, Stchigel, Alberto M. (1999) Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 454-500.
- Hagman HM, Madnick Ellen G. , D'Agostino Anthony N., Williams Paul L. ,Shatsky Stanley, Mirels Laurence F. ,Tucker Richard M., Rinaldi Michael G.,Stevens David A. , Bryant Richard E. (2000) Hyphal Forms in the Central Nervous System of Patients with Coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases* 30, 349–355.
- Jackson K, Edwards R, Bowden D, Leslie D (1996) Evaluation of the Roche Amplicor polymerase chain reaction system for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in specimens. *Pathology* 28.
- Jewell K, Cheshier R, Gary D, Cage B (2008) Genetic diversity among clinical *Coccidioides spp.* isolates in Arizona. *Medical mycology* 46, 449 455.
- Johnson SM, Zimmermann CR, Kerekes KM, Davidson A, Pappagianis D (1998) Evaluation of the susceptibility of *Coccidioides immitis* to lufenuron, a chitin synthase inhibitor. *Medical mycology* 37, 441-444.
- Kilgore E (2000) Miliary Coccidioidomycosis in the Immunocompetent. *Chest* 117, 404-409.
- Kirkland T, Fierer J (1996) Coccidioidomycosis: A Reemerging Infectious Disease. *Emerg Infect Dis* 3, 191-199.
- Laniado-Laborin R (2000) Cartas al Editor: Urge regionalizar los laboratorios de tuberculosis de tercer nivel en México. *Salud Pública México* 42, 171-177.
- Laniado-Laborin R, Cardenas-Moreno RP, Álvarez-Cerro M (1991) Tijuana zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. *Salud Publica Mexico* 33, 235-239.

- Lawrence LSM, and Irving R. Tabershaw, M.D., (1968) Exposure Factors In Occupational Coccidioidomycosis. *A.J.P.H* 58, 107-113.
- Lewis PO, Zaykin D (2001) *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data (Version 1.0 (d16c))*: <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.
- Librado PaR, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Louie L, Ng S, Hajjeh R, Johnson R, Vugia D, Werner SB, Talbot R, Klitz W (1999) Influence of host genetics on the severity of Coccidioidomycosis. *Emerging infectious diseases* 5.
- LLC S (2009) Gene Marker v 1.85.
- Mandel MA, Barker Bridget M, Kroken Scott, Rounsley Steven D, Orbach Marc J. (2007) Genomic and Population Analyses of the Mating Type Loci in *Coccidioides* Species Reveal Evidence for Sexual Reproduction and Gene Acquisition. *Eukaryot Cell* 6, 1189–1199.
- Millar BC, Jiru X, Walker MJ, Evans JP, Moore JE (2003) False Identification of *Coccidioides immitis*: Do Molecular Methods Always Get It Right? *Journal Of Clinical Microbiology* 41, 5778–5780.
- Muñoz B CLR, Calderón I, Vázquez M. E, Manjarrez M. E. (2004) Parasitic Mycelial Forms of *Coccidioides* Species in Mexican Patients. *Journal Of Clinical Microbiology* 42, 1247–1249.
- Pappagianis D (1988) Epidemiology of coccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* 2, 199-238.
- Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis] University of Dublin for "The Excel Microsatellite Tool Kit". , University of Dublin Dublin.
- Peakall R, Smouse PE (2006) *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.*

- Peng TO, Kris I; Orbach, Mark J. (1999) Proline-Rich Vaccine Candidate Antigen of *Coccidioides immitis*: Conservation among Isolates and Differential Expression with Spherule Maturation. *The Journal of Infectious Diseases* 179, 518-521.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Rieseberg LH, Shanna E. (1998) Plant hybridization. *New Phytology* 140, 599-624.
- Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D (2007) Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *Journal of clinical microbiology* 45, 26-30.
- Selkoe KA, Toonen R (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9, 615-629.
- StatSoft I (2004) STATISTICA (data analysis software system) version 7.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Tang Y-W, Procop GW, Persing DH (1997) Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry* 43, 2021–2038.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewnial F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL-Windows interface: flexible strategies for multiple alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y (2006) Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1859-1862.

Valdez M (2008) Coccidioidomycosis pulmonar: 24 años de experiencia en el Hospital Infantil del Estado de Sonora. *Revista Mexicana de Pediatría*. 75, 162-167.

Zender C (2006) "Climate control in Valley Fever in Kern County California". *Biometeorol* 50, 174-182.

Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D (1994) Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 32, 3040-3042.

Apéndice 1

Descripción de las cepas de *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* utilizadas en el presente estudio.

<i>C. immitis</i>					
Etiqueta original	Etiqueta actual	Origen geográfico	Institución	Año de registro	Forma clínica
5233	CiBC01	Baja California	INDRE ²	1966	D.C.
5273	CiBC02	Baja California	INDRE ²	1996	D.N.
M38_05	CiBC03	Baja California	UNAM ¹	-	-
M40_05	CiBC04	Baja California	UNAM ¹	-	-
M54_06	CiBC05	Baja California	UNAM ¹	-	-
M60_09	CiBC06	Baja California	UNAM ¹	-	-
M64_09	CiBC07	Baja California	UNAM ¹	-	-
TJ923	CiBC08	Baja California	HG TIJ ⁴	2010	-
TJ3835	CiBC09	Baja California	HG TIJ ⁴	2010	-
TJ3841	CiBC10	Baja California	HG TIJ ⁴	2010	-
TJ3856	CiBC11	Baja California	HG TIJ ⁴	2010	-
5222	CiCHI01	Chihuahua	INDRE ²	1962	D.C.
5234	CiCHI02	Chihuahua	INDRE ²	1966	D.C.
5238	CiCHI03	Chihuahua	INDRE ²	1967	D.C.
5224	CiCOAH01	Coahuila	INDRE ²	1962	D.C.
M50_06	CiCOAH02	Coahuila	UNAM ¹	-	T
153_08	CiEDMEX01	Edo. De México	INDRE ²	-	L.B
M1_04	CiEU01	Estados Unidos	UNAM ¹	2004	-
M61_09	CiEU02	Estados Unidos	UNAM ¹	-	-
5228	CiGRO01	Guerrero	INDRE ²	1963	D.C
5266	CiMICH01	Michoacán	INDRE ²	1981	D.C.
5270	CiMICH02	Michoacán	INDRE ²	1994	D.C.
251_09	CiMICH03	Michoacán	INDRE	-	ESP.
M52_06	CiND01	-	UNAM ¹	2006	-
M55_06	CiND02	-	UNAM ¹	-	-
M93_09	CiNL01	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
5219	CiSON01	Sonora	INDRE ²	1959	D.C.
5220	CiSON02	Sonora	INDRE ²	1959	D.C.
<i>C. posadasii</i>					
Etiqueta original	Etiqueta actual	Origen geográfico	Institución	Año de registro	Forma clínica
5252	CpBC01	Baja California	INDRE ²	1973	P
M39_05	CpBC02	Baja California	UNAM ¹	-	-
M62_09	CpBC03	Baja California	UNAM ¹	-	-

TJ3910	CpBC04	Baja California	HG TIJ ⁴	2010	-
ENS7795	CpBC05	Baja California	SS ENS ³	2010	ESP.
ENS7804	CpBC06	Baja California	SS ENS ³	2010	ESP.
ENS7811	CpBC07	Baja California	SS ENS ³	2010	ESP.
5255	CpCEN01	Distrito Federal	INDRE ²	1974	C.P.
5268	CpCEN02	Durango	INDRE ²	1982	D.C.
M63_09	CpCEN03	Guerrero	UNAM ¹	-	-
5272	CpCEN04	Morelia	INDRE ²	1996	D.N.
5258	CpCEN05	San Luis Potosí	INDRE ²	1974	D.C.
M57_08	CpCEN06	San Luis Potosí	UNAM ¹	-	-
5207	CpCHI01	Chihuahua	INDRE ²	1957	D.C
5216	CpCHI02	Chihuahua	INDRE ²	1959	P
5225	CpCHI03	Chihuahua	INDRE ²	1963	D.C.
5227	CpCHI04	Chihuahua	INDRE ²	1963	D.C
5229	CpCHI05	Chihuahua	INDRE ²	1963	D.N.
5230	CpCHI06	Chihuahua	INDRE ²	1964	D.C.
5237	CpCHI07	Chihuahua	INDRE ²	1967	P
5239	CpCHI08	Chihuahua	INDRE ²	1967	D.C.
5240	CpCHI09	Chihuahua	INDRE ²	1967	D.C.
5248	CpCHI10	Chihuahua	INDRE ²	1971	D.C.
5256	CpCHI11	Chihuahua	INDRE ²	1976	D.C.
5261	CpCHI12	Chihuahua	INDRE ²	1977	D.C.
5263	CpCHI13	Chihuahua	INDRE ²	1977	D.N.
5264	CpCHI14	Chihuahua	INDRE ²	1977	D.C.
5269	CpCHI15	Chihuahua	INDRE ²	1982	P
5275	CpCHI16	Chihuahua	INDRE ²	1997	D.C.
5209	CpCOAH01	Coahuila	INDRE ²	1957	D.C
5218	CpCOAH02	Coahuila	INDRE ²	1959	P
5223	CpCOAH03	Coahuila	INDRE ²	1962	D.C.
5232	CpCOAH04	Coahuila	INDRE ²	1965	D.C.
5259	CpCOAH05	Coahuila	INDRE ²	1977	P
5265	CpCOAH06	Coahuila	INDRE ²	1981	D.C.
5267	CpCOAH07	Coahuila	INDRE ²	1982	D.O.
M2_04	CpCOAH08	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M3_04	CpCOAH09	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M4_04	CpCOAH10	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M5_04	CpCOAH11	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M9_04	CpCOAH12	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M11_04	CpCOAH13	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M12_04	CpCOAH14	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M13_04	CpCOAH15	Coahuila	UNAM ¹	2004	-

M14_04	CpCOAH16	Coahuila	UNAM ¹	2005	L.C.R.
M15_05	CpCOAH17	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M16_04	CpCOAH18	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M17_04	CpCOAH19	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M18_04	CpCOAH20	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M20_04	CpCOAH21	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M21_05	CpCOAH22	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M22_05	CpCOAH23	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M23_05	CpCOAH24	Coahuila	UNAM ¹	-	L.P.
M24_05	CpCOAH25	Coahuila	UNAM ¹	-	L.B.
M25_05	CpCOAH26	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M26_05	CpCOAH27	Coahuila	UNAM ¹	-	L.B.
M27_05	CpCOAH28	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M28_05	CpCOAH29	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M29_05	CpCOAH30	Coahuila	UNAM ¹	-	L.B.
M30_05	CpCOAH31	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M31_05	CpCOAH32	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M33_05	CpCOAH33	Coahuila	UNAM ¹	-	-
M47_06	CpCOAH34	Coahuila	UNAM ¹	-	T
M49_06	CpCOAH35	Coahuila	UNAM ¹	-	T
M51_06	CpCOAH36	Coahuila	UNAM ¹	-	T
14_06	CpCOAH37	Coahuila	INDRE ²	-	ESP.
5226	CpMICH01	Michoacán	INDRE ²	1964	P
5260	CpMICH02	Michoacán	INDRE ²	1977	P
5262	CpMICH03	Michoacán	INDRE ²	1976	-
5276	CpMICH04	Michoacán	INDRE ²	1997	D.C.
5277	CpMICH05	Michoacán	INDRE ²	1998	P
5235	CpND01	-	INDRE ²	1967	P
FM_677	CpND02	-	UNAM ¹	-	-
FM_820	CpND03	-	UNAM ¹	-	-
M8_04	CpND04	-	UNAM ¹	2004	B.H.
M34_05	CpND05	-	UNAM ¹	-	-
M35_05	CpND06	-	UNAM ¹	-	-
M41_05	CpND07	-	UNAM ¹	-	-
M42_05	CpND08	-	UNAM ¹	-	-
M43_05	CpND09	-	UNAM ¹	-	-
M45_05	CpND10	-	UNAM ¹	-	-
M53_06	CpND11	-	UNAM ¹	-	-
M56_08	CpND12	-	UNAM ¹	2008	-
M92_09	CpND13	-	UNAM ¹	-	-
M95_09	CpND14	-	UNAM ¹	-	-
1	CpNL01	Nuevo León	UNAM ¹	2005	L.C.R.
2	CpNL02	Nuevo León	UNAM ¹	2005	A.C.

3	CpNL03	Nuevo León	UNAM ¹	2005	L.B.
6	CpNL04	Nuevo León	UNAM ¹	2005	T.C.
7	CpNL05	Nuevo León	UNAM ¹	2005	L.B.
8	CpNL06	Nuevo León	UNAM ¹	2004	S.B.
9	CpNL07	Nuevo León	UNAM ¹	2005	H.E.
11	CpNL08	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.B.A.
12	CpNL09	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.B.A.
15	CpNL10	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.C.R.
17	CpNL11	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.C.R.
18	CpNL12	Nuevo León	UNAM ¹	2004	S.A.
19	CpNL13	Nuevo León	UNAM ¹	2004	S.B.
20	CpNL14	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.C.R.
22	CpNL15	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.B.
24	CpNL16	Nuevo León	UNAM ¹	2003	ESP.
25	CpNL17	Nuevo León	UNAM ¹	2003	B.P.
26	CpNL18	Nuevo León	UNAM ¹	2003	T.P.
28	CpNL19	Nuevo León	UNAM ¹	2003	L.P.
29	CpNL20	Nuevo León	UNAM ¹	2004	L.B.A.
31	CpNL21	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
33	CpNL22	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
34	CpNL23	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
35	CpNL24	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
39	CpNL25	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
40	CpNL26	Nuevo León	UNAM ¹	-	-
5204	CpSIN01	Sinaloa	INDRE ²	1957	D.C
5208	CpSIN02	Sinaloa	INDRE ²	1957	D.C
5215	CpSIN03	Sinaloa	INDRE ²	1959	P
185_08	CpSIN04	Sinaloa	UNAM ¹	-	CUT.
5210	CpSIN05	Sonora	INDRE ²	1957	D.C
5213	CpSIN06	Sonora	INDRE ²	1957	D.C
5221	CpSIN07	Sonora	INDRE ²	1960	D.C.
5236	CpSIN08	Sonora	INDRE ²	1967	D.C.
5245	CpSIN09	Sonora	INDRE ²	1970	P
5247	CpSIN10	Sonora	INDRE ²	1971	D.C.
5250	CpTAM01	Tamaulipas	INDRE ²	1972	D.C.
5251	CpTAM02	Tamaulipas	INDRE ²	1973	D.C.
5271	CpTAM03	Tamaulipas	INDRE ²	1995	DIS
5278	CpTAM04	Tamaulipas	INDRE ²	1998	L.C.R.
5206	CpTAM05	Zacatecas	INDRE ²	1957	D.C

L.C.R. líquido cefalorraquídeo, L.B. lavado bronquial, S.B. secreción bronquial, L.B.A. lavado broncoalveolar, - Desconocido, D.C. Diseminada cutánea, D.N. diseminada neurológica, C.P. Cutánea primaria, A.C. Absceso cuello, B.H. biopsia de hueso, B.P. Biopsia pleural, T.C. Tumor Cuello, H.E. Hemocultivo, S.A. Secreción Articular, ESP. Espudo, T.P Tejido Pleural, L.P. Líquido Pleural, P Pulmonar, DIS Diseminada, CUT Cutánea. ¹ Universidad Nacional Autónoma de México, ² Instituto de Referencia y Reporte Epidemiológico, ³ Secretaría de Salud Ensenada, ⁴ Hospital General de Tijuana.

Apéndice 2

Alelos por locus determinados con base en el análisis de ocho loci de microsatélites para *C. immitis*.

LOCUS							
KO9	621.2	GA37	ACJ	KO7	KO1	GAC2	KO3
146	416	228	200	293	236	207	239
148	418	230	201	294	243	219	241
155	419	232	203	296	245	221	
157	421	241	209			223	
161	424		212			225	
163	426		213			227	
165			214				
167							
169							

Apéndice 3

Alelos por locus determinados con base en el análisis de ocho loci de microsatélites para *C. posadasii* de este estudio

LOCUS							
KO9	621.2	GA37	ACJ	KO7	KO1	GAC2	KO3
131	399	214	187	287	229	206	227
144	215	189	292	231	229		
148	216	294	233	237			
149	217	296	235	239			
150	219	298	237	241			
152	230	299	239	243			
154	232	301	241	250			
156	233	243	252				
	247	245	256				
	248	247	258				
	250	249	260				
	251	264					

Apéndice 4

Diversidad genética por población. N=número de individuos, Na=número de alelos, Ar= riqueza alélica. Se muestran marcadas en **negrita** los valores de este estudio y en la columna de la derecha lo obtenido con los datos de Fisher (2002). Ci = C. immitis y Cp = C. posadasii.

Población	Locus	N	N	Na	Na	Ar	Ar
Ci	KO9	28	54	9	11	1.9	1.8
	621.2	28	51	6	8	1.7	1.6
	GA37	27	54	4	13	1.7	1.7
	ACJ	28	52	7	11	1.7	1.2
	KO7	28	49	3	3	1.3	1.2
	KO1	28	53	3	4	1.1	1.3
	GAC2	28	54	6	7	1.9	1.8
	KO3	28	52	2	2	1.2	1.2
Cp	KO9	126	95	8	9	2.2	2.2
	621.2	126	95	1	4	1.0	1.4
	GA37	125	96	11	13	2.6	3.3
	ACJ	124	97	2	3	1.1	1.7
	KO7	126	92	7	8	1.9	1.9
	KO1	126	96	12	11	2.6	2.9
	GAC2	126	97	1	1	1.0	1.0
	KO3	125	97	12	15	2.6	3.6