

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



**“IDENTIFICACIÓN DE *Coccidioides spp* EN MUESTRAS DE TEJIDOS PARAFINIZADOS
UTILIZANDO TRES TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES”**

TESIS

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

CARLOS GABRIEL GONZÁLEZ BECUAR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS DE ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE *Coccidioides spp* EN MUESTRAS DE TEJIDOS PARAFINIZADOS
UTILIZANDO TRES TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES”**

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

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

CARLOS GABRIEL GONZÁLEZ BECUAR

Aprobada por:

DRA. RAQUEL MUÑIZ SALAZAR
DIRECTORA DE TESIS

DRA. LAURA ROSIO CASTANON OLIVARES
SINODAL

DR. RAFAEL LANIADO LABORIN
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Deseo empezar por agradecer a mi esposa Marisol, mi madre Gabriela, mi hermano Elizard y mi padre Carlos, el principal promotor e impulsor de mi superación realizando estudios de posgrado y un gran ejemplo a seguir, en mi opinión, para cualquier persona.

Agradezco a la Dra. Raquel Muñiz, mi directora de tesis, que me dio la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo y enseñarme como hacer un trabajo de calidad de una manera eficiente y correcta. También por instruirme en el uso de técnicas de investigación y el uso de programas computacionales para realizar mi tesis.

Agradezco al equipo de trabajo del Laboratorio de Ecología y Epidemiología Molecular que está integrado por las encargadas que son Sandy y Nelva y mis compañeros estudiantes Alejandra y Norma, así como los ya Maestros que me brindaron mucho apoyo como Lalo y Jorge. De verdad les agradezco en todo lo que me echaron la mano y les deseo lo mejor en su futuro. De igual manera agradezco el apoyo de los otros docentes de la Escuela de Ciencias de la Salud, UABC Campus Valle Dorado por impulsar este tipo desarrollo, y de entre estos docentes de una manera muy especial reconozco a Raúl Baptista como el principal impulsor de mi decisión de estudiar un posgrado tan fascinante como éste.

Agradezco también a los docentes del Posgrado en Ecología Molecular que me transmitieran sus conocimientos de una manera tan fácil

de captar, y lo hicieron tan bien ya que verdaderamente son expertos en sus temas. En especial quiero mencionar a los doctores Luis Enríquez e Ivone Giffard por su valioso apoyo y enseñanza en las bases y técnicas de biología celular y molecular. También agradezco a la Dra. Riquelme de CICESE Ensenada por su apoyo e inspiración para convertirme en un investigador.

También agradezco a mis compañeros de clase por aportar nuevas ideas para aplicarlas en mis estudios, así como dar orientación en cuanto a mis dudas por no estar tan familiarizado inicialmente con los temas y también por comportarse como mis hermanos al momento de tratarse de ser amigos.

Agradezco la ayuda brindada por Deyanira Rodarte del Laboratorio de Histología para realizar una parte crucial de mi experimento y también reconozco la importante orientación brindada por la Dra. Evarista Arellano.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado con la beca numero: 329402/236548.

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

RESUMEN

La coccidioidomicosis (CM), es una micosis sistémica endémica de las zonas desérticas de América. Este padecimiento es ocasionado por dos especies de un hongo ascomiceto dimórfico: *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*. La situación epidemiológica actual de la CM en México se desconoce, ya que desde 1995 no se cuentan con registros nacionales globales de su incidencia y prevalencia; sin embargo hay publicaciones y estudios regionales que muestran algunas estadísticas respecto a esta enfermedad (Castañeda-Godoy & Laniado-Laborin 2002; Muñoz et al. 2004; Cano-Rangel et al. 2006; Castañón et al. 2007; Laniado-Laborin 2007). En México, las áreas endémicas de CM se distribuyen principalmente en la frontera norte (Baja California, Sonora, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas). El objetivo de este estudio es identificar la especie predominante de *Coccidioides* en muestras histopatológicas fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE) de pacientes con diagnóstico clínico de CM, que acudieron al Hospital General de Tijuana (HGT) y relacionar la especie de *Coccidioides* con las características clínicas del paciente.

Las muestras se obtuvieron del Departamento de Patología del HGT, el cual tenía registrado 160 pacientes diagnosticados con CM desde Octubre de 1982 hasta Marzo del 2010. Los pacientes provinieron de diferentes unidades del Hospital General, localizadas en los cinco municipios de Baja California (Mexicali, Tijuana, Ensenada, Tecate y Rosarito). En total, se obtuvieron 129 muestras de FFPE a estudiar, de las cuales en 109 (85%) se identificó la presencia de *Coccidioides spp.* mediante la amplificación del gen Antígeno Rico en Prolina (Ag2/PRA) descrito por Bialek et al. (2004)

La especie predominante en pacientes diagnosticados con CM en el período de 1982 a 2010 en Baja California fue *C. posadasii* (84.5%). Más del 90% de los pacientes infectados tanto por *C. posadasii* como por *C. immitis*, presentaron enfermedad extrapulmonar.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	5
3. HIPOTESIS	14
4. OBJETIVO GENERAL	15
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
5. METODOLOGIA	16
5.1 OBTENCION DE MUESTRAS	16
5.2 MANEJO DE MUESTRAS CLINICAS	16
5.3 REMOCION DE PARAFINA Y EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	17
5.3.1 Remoción de parafina	17
5.3.2 Extracción de DNA	17
5.3.3 Método de extracción de DNA 1	17
5.3.4 Método de extracción de DNA 2	18
5.3.5 Método de extracción de DNA 3	18
5.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Coccidioides</i> spp.	19
5.4.1 Amplificación del gen <i>Ag2/PARA</i>	19
5.4.2 Región Umeyama	20
5.4.3 Purificación de productos amplificados	21
5.4.4 Análisis de las secuencias	21
5.4.5 Análisis de microsatélites	22

5.5 ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO	22
5.5.1 Obtención de Datos	22
5.5.2 Análisis de Datos	23
6. RESULTADOS	24
6.1 EXTRACCION DE DNA	24
6.2 IDENTIFICACION MOLECULAR DE <i>Coccidioides spp.</i>	24
6.2.1 Amplificación y secuenciación del gen <i>Ag2/PRA</i>	24
6.2.2 Región Umeyama	29
6.2.3 Análisis de Microsatélites	29
6.3 Análisis epidemiológico de las muestras en relación con <i>Coccidioides spp.</i>	29
6.3.1 Frecuencia de las localizaciones de CM	29
6.3.2 Relación de la especie <i>C. posadasii</i> y <i>C. immitis</i> con diagnóstico histopatológico	30
6.3.4 Relación del género en los pacientes de las muestras estudiadas y con <i>C. posadasii</i> y <i>C. immitis</i>	31
6.3.5 Rangos de edad de los pacientes de las muestras analizadas	32
7. DISCUSION	33
8. CONCLUSIONES	37
9. BIBLIOGRAFIA	xx

1. INTRODUCCION

La coccidioidomicosis (CM), también conocida como Fiebre del Valle de San Joaquín, es una micosis sistémica endémica de las zonas desérticas de América que afecta principalmente a mamíferos, incluyendo al hombre. La CM es ocasionada por el hongo ascomiceto dimórfico *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* (2007). La CM es una enfermedad altamente infecciosa, no se transmite de persona a persona y se adquiere tras la inhalación de artroconidia o al entrar en contacto con el tejido de manera percutánea. La inhalación de solo un artroconidio puede desarrollar CM (Pappagianis & Zimmer 1990).

La distribución geográfica de *Coccidioides spp.* se limita al continente americano (Ajello 1967), sin embargo, se han reportado casos de CM en Europa (Lefler *et al.* 1992) y Asia (Wang *et al.* 2011) pero no se han reportado aislamientos ambientales de *Coccidioides spp.* en estas áreas. En Estados Unidos de América, los principales focos endémicos son los estados de California, Arizona, Nuevo México y Texas. También existen casos reportados de CM en Argentina (Posadas 1892), y en otros países de Sudamérica, donde se ha aislado *Coccidioides spp.* de muestras de suelo (de Aguiar Cordeiro *et al.* 2007). La zona endémica de CM en México, incluye la región fronteriza norte, abarcando los estados de Baja California, Sonora, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Baptista-Rosas & Riquelme 2007). Para el caso de Baja California, se han registrado casos de CM en pacientes provenientes de algunos municipios del estado (Tijuana, Mexicali y Ensenada) (Laniado-Laborin *et al.* 1991; Baptista-Rosas *et al.* 2009). En Baja California se presentan altas prevalencias de tuberculosis (TB) e infección por VIH, presentando cuadros clínicos indistinguibles a los de la CM pulmonar (Centers of Disease Control and Prevention 2001), se tiene registrado una alta prevalencia de TB y CM entre la población pediátrica.

Estudios realizados por Laniado-Laborin *et al.* (1997) en la ciudad de Tijuana muestran que el 46% de la población escolar es reactor a tuberculina y el 10% es reactor a coccidioidina. Otros estudios llevados a cabo en esa misma ciudad demuestran que 1 de cada 6 casos de pacientes con diagnóstico clínico de TB fueron positivos a CM durante el estudio microbiológico (Burgueño-Duarte 1997). Otros autores también han confirmado que TB y CM son padecimientos que comparten características epidemiológicas, radiológicas, clínicas e histopatológicas muy similares y en algunos casos pueden coexistir en el mismo paciente (Stein 1953; Spivey *et al.* 1969; Castañeda-Godoy & Laniado-Laborin 2002).

Uno de los principales problemas para diagnosticar CM, es que el manejo del patógeno requiere bioseguridad nivel 3 (BSL3). El estándar de oro para el diagnóstico de CM es el cultivo microbiológico de muestras clínicas. Sin embargo, los cultivos son altamente infecciosos y tardan en crecer de 3 a 5 días. Por otro lado, las pruebas serológicas son ampliamente utilizadas para el diagnóstico de CM (Kaufman *et al.* 1982; Johnson & Pappagianis 1992), pero el resultado debe ser comprobado con otro método diagnóstico. El examen histopatológico, no es una prueba de rutina, pero es de gran valor diagnóstico cuando se observan las esférulas con endosporas (Saubolle *et al.* 2007) e incluso una manera atípica, con presencia de hifas (Zepeda *et al.* 1998; Muñoz *et al.* 2004).

En los últimos años las técnicas de biología molecular han sido utilizadas ampliamente para el estudio de agentes patógenos infecciosos (Tang *et al.* 1997; Collins & Grange 1999; Dixon 2001). Los métodos moleculares tienen la ventaja de ser específicos y rápidos, no es necesario el cultivo de los organismos y se requiere una cantidad mínima de muestra. Por lo que, los resultados se pueden obtener en un tiempo menor que el

cultivo microbiológico y de esta manera poder iniciar el tratamiento (Jackson *et al.* 1996). Los datos moleculares permiten comparar el genotipo de organismos aislados de muestras clínicas con organismos silvestres (Bart-Delabesse *et al.* 1998). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular que se ha utilizado ampliamente, con resultados excelentes en la epidemiología, investigación clínica, ecología humana y en los sistemas socioculturales (Dickinson 2004). Sin embargo, el éxito de la PCR depende principalmente de la calidad del DNA extraído del organismo a estudiar. El DNA extraído a partir de muestras de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE), ha mostrado distintos niveles de sensibilidad en el análisis de PCR, algunos estudios han obtenido muy baja sensibilidad mientras que en otros se reporta 100% de especificidad y 70% sensibilidad en PCR tiempo real (Binnicker *et al.* 2007). Esto es debido a que la muestra al ser procesada con formaldehído pierde su capacidad infecciosa (Gromadzki & Chaturvedi 2000), pero se daña el DNA presente.

Aun cuando en la actualidad no se lleva una notificación oficial de los casos de CM, la mayoría de los hospitales conservan los bloques de parafina después de realizar el diagnóstico. En el caso de los hospitales del Sector Salud de Baja California, se han logrado identificar alrededor de 158 casos de pacientes diagnosticados histopatológicamente con CM. Sin embargo, no se tiene identificada la especie de *Coccidioides*, ni su asociación con las características clínicas; esto debido a que solo se ha utilizado la confirmación del género *Coccidioides* para iniciar el tratamiento farmacológico

El objetivo general de este estudio fue identificar molecularmente las especies de *Coccidioides*, en muestras clínicas de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE), determinar su frecuencia y estimar la asociación especie/presentación clínica, en pacientes diagnosticados con CM en el periodo de 1982–2010 del HG de Tijuana.

2. ANTECEDENTES

La CM es una micosis profunda causada por las especies de hongo *C. immitis* y *C. posadasii* pertenecientes al filo *Ascomycota* (Blair 2009). La CM fue descrita por primera vez en Argentina (Posadas 1892), siendo *C. immitis* la especie que fue identificada como el agente causal. La segunda especie identificada fue *C. posadasii*, descrita por Fisher *et al.* (2002) utilizando métodos moleculares para hacer esta distinción, ya que morfológicamente son idénticas.

Ambas especies son dimórficas, es decir, tienen dos etapas de vida: la saprotrófica que se desarrolla en el suelo en forma filamentosa como un micelio y la parasitaria, esférulas con endosporas, que se desarrolla en el hospedero. Hasta el momento no se ha documentado la etapa sexual, sin embargo, por métodos moleculares se ha reportado que existe recombinación y sexo biparental muy probablemente en la etapa saprotrófica (Burt *et al.* 1996), sin embargo el autor menciona también que el hongo puede tener una fase “parasexual” no meiotica.

El micelio crece habitualmente en el suelo (Ajello 1956), la hifa mide de 2 a 4 μm de diámetro y en un periodo de cinco a siete días (Pappagianis & Zimmer 1990) forma *artroconidia* de tipo enteroartrico y sufre un proceso de fragmentación denominado rexolisis, el cual consiste en que las *artroconidia* se encuentran separadas una de otra por paredes frágiles formadas por la autólisis de un artroconidio adyacente (Kirkland & Fierer 1996). Esto hace que la hifa se fragmente y las *artroconidia* sean fácilmente separadas por acción del viento o movimiento de la tierra, éstas pueden formar nuevas hifas o infectar a un hospedero. Se han reportado casos clínicos en los cuales se presentan hifas como estructuras parasitarias en los tejidos humanos (Puckett 1954; Fiese *et al.* 1955; Muñoz *et al.* 2004). El

hongo sobrevive durante los periodos de sequía en el suelo, a menos de 20 cm de la superficie, y no aparece sobre éste hasta después de transcurrida la época de lluvias entre invierno y primavera, y se multiplica al final de la época de verano y otoño, uno de los motivos por los cuales hay brotes de CM en ésta época (Swatek 1970).

La CM afecta principalmente a mamíferos, incluyendo al hombre, aunque también puede infectar reptiles (Kolivras & Comrie 2003). La CM es altamente infecciosa en su hábitat natural, no se transmite de persona a persona, pero se ha reportado casos extraordinarios de transmisión, como de un gato a un humano por medio de una mordida (Gaidici & Saubolle 2009). La manera más común de adquirir CM es la inhalación de *artroconidia*, éstas se convierten en esférulas multinucleadas en los bronquiolos y ocasionalmente, por vía hematógica o linfohematógica se transporta el hongo fuera de pulmón (Blair 2009). En modelos murinos la inhalación de solo un artroconidio puede desarrollar la CM (Pappagianis & Zimmer 1990). La CM también se puede adquirir mediante una implantación cutánea directa (Levan 1954; Overholt & Hornick 1964). Las esférulas inmaduras miden de 60-100 μm de diámetro y adquieren una pared gruesa formada de glucanos, quitina y polímeros de manosa. En su interior, el núcleo se divide dando lugar a esférulas segmentadas y multinucleadas. Cada uno de los segmentos nucleares que se forman en la esférula recibe el nombre de endospora. Una esférula madura contiene alrededor de 800 a 1,000 endosporas, las cuales, una vez liberadas, tienen el potencial de convertirse en nuevas esférulas (Muñoz-Hernández 2008)

Los casos de CM se consideran endémicos del suroeste de Estados Unidos, el norte de México y algunas áreas limitadas de Sudamérica. En América del Norte se asocian particularmente a la Zona de Vida de Sonora Baja (Lower Sonoran) descrita por Merriam (1890), la cual abarca el

desierto de Mojave (California, Utah y Arizona) en E.U.A y los estados de Sonora y Chihuahua en México, región caracterizada por meses calurosos de altas temperaturas en verano y temporada de invierno corta, con una precipitación anual de 5 a 20 pulgadas y suelo alcalino (Chiller *et al.* 2003). En Centro y Sudamérica se han reportado casos en los países Honduras, Guatemala, Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia, Brasil, Paraguay y Argentina (Negroni 2008). Se ha reportado que el suelo y las condiciones climáticas de esos lugares de donde proceden los casos humanos de CM, son ideales para el crecimiento del agente fúngico. Gran cantidad de brotes de CM se han relacionado a eventos climatológicos.

Los datos epidemiológicos de CM que se tienen registrados de forma oficial en México son hasta 1995, esto debido a que a partir de este año la CM fue excluida del informe para el registro epidemiológico nacional, a pesar de que la Ley General de Salud 2011 incluye el reporte de las micosis profundas. Los estados con el mayor número de casos reportados hasta 1995 eran Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango y Nuevo León (Calderon-Garcidueñas *et al.* 2004; Castañon-Olivares *et al.* 2004; Cano-Rangel *et al.* 2006). Se presume que la situación actual de la enfermedad en México puede estar siguiendo un desarrollo parecido al que se reporta en Estados Unidos (Baptista-Rosas & Riquelme 2007), aproximadamente 150,000 casos por año (Galgiani *et al.* 2005).

De todos los casos de CM que se registran, alrededor de la mitad o dos tercios del total se manifiestan de una manera subclínica (Galgiani *et al.* 2005) y estos desarrollan cierta inmunidad a futuras primoinfecciones por este mismo agente. La primoinfección presenta un cuadro autolimitado agudo o subagudo de una Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC), éste inicia 1-3 semanas después de la exposición al agente. Éste cuadro es indistinguible clínicamente de las NAC causadas por cualquier otro agente,

por lo que los estudios de imagen solo ayudan a identificar un cuadro neumónico. Para su diagnóstico etiológico es indispensable el uso de herramientas de laboratorio. Los síntomas clínicos como fatiga, disnea, tos y fiebre pueden durar días o meses. Las lesiones cutáneas que son producto de la diseminación a partir de un foco neumónico son: pápulas, pústulas, placas verrugosas, abscesos, úlceras y nódulos, éstos últimos son los más comunes (Crum *et al.* 2004), un eritema nodoso puede aparecer solo unos días y su aparición se relaciona con buen pronóstico (Pappagianis & Zimmer 1990).

Alrededor del 90% de los individuos que padecen lesiones dérmicas, son resultado de una infección extrapulmonar; un muy bajo porcentaje de pacientes, presentan infecciones cutáneas adquiridas por contacto directo. Además de piel y tejido celular subcutáneo, otro lugar de diseminación es el sistema nervioso central (Janis 2007). El 5 a 10% de las personas con CM permanece con secuelas como nódulos pulmonares o cavidades de pared delgada conocidas como cavernas. La CM diseminada se puede presentar en cualquier parte del cuerpo, aunque los lugares más comunes son piel, hueso y meninges (Stevens 1995). Un porcentaje menor de individuos manifiestan infección crónica pulmonar o extrapulmonar y en algunos puede ocasionar la muerte. La severidad de la CM también depende de ciertos factores del huésped, por ejemplo, pacientes inmunocomprometidos con enfermedades como SIDA, tuberculosis, linfoma, receptores de órganos, o cualquier enfermedad que requiera altas dosis de corticoesteroides y factor de necrosis tumoral, son vulnerables a adquirir la infección y padecer la enfermedad.

El "estándar de oro" para el diagnóstico de CM es el cultivo del hongo a partir de muestras clínicas. *Coccidioides spp.* es un agente fácil de cultivar y prácticamente crece en cualquier medio existente en los

laboratorios clínicos (Galgiani 1993). Se desarrolla rápidamente y se puede observar micelio de dos a cinco días después de la siembra. El cultivo de *Coccidioides spp.* es fácil de identificar, sin embargo la sensibilidad del cultivo es baja ($\leq 50\%$) (Vucicevic *et al.* 2010). Si es requerido, el medio de cultivo debe ser abierto dentro del BSL3, ya que en esta etapa, el agente es altamente infeccioso.

Las pruebas serológicas en individuos con sospecha de CM también son ampliamente utilizadas para el diagnóstico. Las que mayormente se utilizan identifican anticuerpos precipitantes o fijadores del complemento del tipo IgM o IgG, esas técnicas son: Precipitación en Tubo Capilar (TP), fijación del complemento (CF) y doble inmunodifusión (DID) (Kaufman *et al.* 1982; Johnson & Pappagianis 1992). Los ensayos inmunoenzimáticos son más sensibles (Janis & Currier 2008) y permiten la detección tanto en sangre como en orina (Durkin *et al.* 2008), incluso cuando hay manifestaciones leves y principalmente cuando es severa la enfermedad, sin embargo aun se necesitan mejorar ya que presentan reacción-cruzada con antígenos de *Histoplasma sp.*

El análisis citológico para la identificación de esférulas en muestras de tejido y fluidos es un método rápido para obtener un diagnóstico (Buiuc *et al.* 1990; Sobonya *et al.* 1990; DiTomasso *et al.* 1994), aunque resulta positivo en dos tercios de los casos (Durkin *et al.* 2008). El hongo se tiñe fácilmente con hematoxilina-eosina, ácido periódico de Shiff (PAS), tinciones argénticas y fluoresce bajo CFW (Calcoflour White).

El examen histopatológico no es una prueba de rutina, ya que las técnicas de obtención de las muestras son invasivas. Sin embargo, una ventaja de esta técnica es que no es necesario instalaciones BSL3 para la obtención y procesamiento de la muestra. Esto es debido a que el patógeno al ser fijado con formaldehído pierde su capacidad infecciosa-(Gromadzki &

Chaturvedi 2000). Además, para estudios retrospectivos, donde no se cuentan con aislados clínicos, son de gran valor.

En la epidemiología e investigación clínica, el uso de diversas técnicas moleculares ha incrementado y actualmente son herramientas fundamentales para estudiar, detectar y analizar microorganismos de enfermedades infecciosas (Fernández-Cuenca 2004). Estas técnicas han probado ser mejores que las convencionales que se enfocan en el análisis morfológico y sus variantes en el crecimiento, y métodos que dependen del fenotipo del microorganismo estudiado (Tang *et al.* 1997).

Las técnicas moleculares de identificación de organismos basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dependen principalmente de la calidad del DNA del organismo a estudiar. Cuando el DNA se extrae directamente de muestras de tejido fresco, la calidad y cantidad del DNA obtenido es alta. En el caso de la CM meníngea, se extrae el DNA directamente del líquido cefaloraquídeo y ha demostrado ser positivo en un 100% (Binnicker *et al.* 2011). Sin embargo, cuando se utilizan muestras FFPE que han sido almacenadas por muchos años, la calidad del DNA disminuye. El formaldehído ha sido una sustancia útil para la preservación de material biológico, sin embargo, degrada el DNA (Coombs *et al.* 1999). El tejido al ser expuesto al formaldehído sufre varias reacciones químicas, por ejemplo, se genera una adición de un sustituto hidroximetilo a los grupos aminos primarios y secundarios de la respectiva base en la cadena del DNA. Las muestras con mayor antigüedad muestran una correlación negativa entre la exposición al formaldehído y el éxito en la PCR. La extracción de DNA de *Coccidioides spp.* de muestras de tejido FFPE, en algunos estudios, ha demostrado tener hasta un 100% de especificidad y 70% sensibilidad en PCR de Tiempo Real (Binnicker *et al.* 2007). Dependiendo del tipo de muestra clínica con el que se cuente (citológica,

tejido fresco, tejido FFPE, cultivo) será el tiempo que se necesite para realizar la extracción de DNA, lo cual puede variar de un día para el caso de muestra citológica a dos días para el resto de las muestras anteriormente citadas. A partir del DNA extraído de la muestra, el resultado del análisis de PCR para *Coccidioides* spp., se puede obtener en un máximo de dos días (Luna-Isaac 2010; Vucicevic et al. 2010)

Existen varios métodos para extraer el DNA de tejidos FFPE, el primero descrito fue en 1985 que consistía en el uso de xileno y etanol para disolver la cera y deshidratar el tejido (Goelz *et al.* 1985). Otro método consiste en derretir la cera utilizando un horno de microondas (Banerjee *et al.* 1995), o bien la digestión directa del tejido FFPE (de Lamballerie *et al.* 1994). Lo más reciente es la fabricación de kits de diversas compañías para extraer de DNA de éstos tejidos.

Las regiones de DNA que más se han utilizado en la identificación molecular de *Coccidioides* han sido los nueve loci de Fisher *et al.* (1999), la región Ag2/PRA de Bialek *et al.* (2004), la región amplificada por los cebadores Coi9 de Umeyama (2006) y la región ITS2 de Binnicker *et al.* (2007).

Los microsatélites son secuencias repetitivas cortas, usualmente de 10 pares de bases (pb), que presentan un nivel alto de polimorfismo, y se encuentran en genomas eucariotas. El polimorfismo de los microsatélites puede ser evaluado por PCR y el tamaño preciso de los alelos puede ser medido por secuenciación directa. Anteriormente se han utilizado para tipificar hongos como *Candida albicans* (Lunel *et al.* 1998) y *Aspergillus fumigatus* (Bart-Delabesse *et al.* 1998), así como para identificar nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. En el año 2002, Fisher *et al.*, identificó a *C. posadasii* como una nueva especie mediante la amplificación

de nueve microsatélites por PCR, a partir del ADN obtenido de diferentes aislamientos de *Coccidioides* y reportó la aparente simpatria entre ambas especies de *Coccidioides* en las regiones del sur de California y norte de México (Fisher *et al.* 2002). Luna-Isaac (en prensa) utilizando estos mismos microsatélites, reportó que las cepas de *C. immitis* encontradas en otras regiones de México provienen de las mismas regiones antes mencionadas.

Dos métodos se han utilizado para realizar detección de *Coccidioides spp.*, en muestras histopatológicas, el primero fue descrito por Bialek *et al.* (2004) donde utiliza una parte de la secuencia del gen *Ag2/PRA*, un antígeno de la pared de este hongo, rico en prolina. El segundo fue descrito por Binnicker *et al.* (2007) utilizando la región interna de transcripción (ITS2) de este agente. En ésta última prueba se reporta una sensibilidad de 73% y en ambas especificidad de 100%.

3. HIPOTESIS

Las muestras clínicas de tejido FFPE son útiles para el diagnóstico y estudio de *Coccidioides* spp., ya que métodos moleculares recientes pueden amplificar su DNA e identificarlo a nivel de especie, sin correr los riesgos de contagio que presentan otros métodos convencionales de detección y con un 100% de especificidad.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar molecularmente *Coccidioides spp.*, a partir de muestras clínicas de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE) de pacientes diagnosticados con CM utilizando tres marcadores moleculares específicos para *Coccidioides spp.*

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la especie de mayor incidencia en pacientes diagnosticados con CM en el periodo de 1982–2010 en el HG de Tijuana.
2. Determinar si existe relación entre la especie de *C. immitis* y *C. posadasii* con la presentación clínica de CM así como con los datos epidemiológicos del paciente.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCION DE MUESTRAS

Las muestras analizadas fueron un total de 129 obtenidas del servicio de Patología del HGT (128 bloques de parafina) y de ISESALUD Ensenada (un bloque de parafina). Dichas muestras comprenden un periodo de colecta desde el año de 1982 hasta el 2010. Previo a 1982, no se tenía nada registrado, y se llegó hasta 2010, debido a que en este año se inició la investigación. Todas las muestras seleccionadas tenían el diagnóstico de CM según el tejido en el que se encontraron: cutánea, ganglionar, ósea, partes blandas (músculo, tejido adiposo y tejido conectivo), pulmonar, diseminada (que se encontró el hongo en más de un solo tejido extrapulmonar) y la presentación de la enfermedad en un solo tejido extrapulmonar. También se obtuvo la información del reporte de la imagen microscópica de *Coccidioides* (esférulas inmaduras, maduras, endosporas libres, hifas) cuando se hizo el diagnóstico. Los bloques de parafina seleccionados se transportaron al Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de Escuela de Ciencias de la Salud, UABC Campus Valle Dorado

5.2 MANEJO DE MUESTRAS CLINICAS

Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 60 µm con un micrótopo, y se almacenaron de forma individual en tubos de 1.5 mL a -80°C hasta la remoción de parafina y extracción de DNA. Es importante mencionar que no se realizó una tinción sobre estos cortes para detectar la presencia de *Coccidioides spp.*

5.3 REMOCION DE PARAFINA Y EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

5.3.1 Remoción de parafina

Para la remoción de parafina del corte histopatológico se utilizó el método descrito por Coombs *et al.* (1999) con modificaciones. En un tubo

de 500 μ L se colocaron de 8 - 10 cortes de 60 μ m y se agregaron 150 μ L de 0.5% Tween-20. Se agitó suavemente y se colocó en un termociclador marca Eppendorf personal cycler a 90 °C por 10 min y 55 °C por 30 s. La muestra se centrifugó a 12,000 g por 10 min y se dejó a 20°C por 10 min. Una vez que la cera se solidificó se procedió a removerla con una punta para pipeta estéril o con pinzas.

5.3.2 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA a partir de las muestras FFPE se probaron tres métodos diferentes, con el objetivo de obtener la mayor cantidad y calidad de DNA de *Coccidioides spp.* Se utilizó como cepa de referencia la M-38-05 (Luna-Isaac, en prensa).

5.3.3 Método de extracción de DNA 1

Se agregaron 650 μ L de CTAB/PVP a un tubo estéril de 1.5 mL con muestra de tejido obtenido. Se agitó en vortex por 10 min y se agregó 3 μ L de RNasa. Se incubó 2 hrs con agitación a 60°C. Después fueron adicionados 400 μ L de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) a cada muestra. Se agitó en vortex por 5 minutos a máxima velocidad y se centrifugó 15 min a 6000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 mL. Se volvió agregar 400 μ L de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) a cada muestra y se agitaron en vortex por 5 min a máxima velocidad y se centrifugaron 15 min. Una vez más se transfirió el sobrenadante. Se adicionó 0.7 volúmenes de alcohol isopropílico y se incubó -20°C toda la noche. Se centrifugó por 20 min a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se lavo con 300 μ L de 70% EtOH, se agitó suavemente y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se hidrató con 20 μ L de 1X TE. Se almacenó a -80 C hasta su posterior análisis.

5.3.4 Método de extracción de DNA 2

Se agregaron 650 μL de CTAB/PVP a un tubo estéril de 1.5 mL con muestra de tejido obtenido después de la remoción de parafina. Se agitó en vortex por 10 min y se agregó 3 μL de RNAsa. Se incubó 3 hrs con agitación a 56°C. Después fueron adicionados 400 μL de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) a cada muestra. Se agitó en vortex por 5 min a máxima velocidad y se centrifugó 15 min a 6000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 mL. Se volvió agregar 400 μL de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) a cada muestra y se agitaron en vórtex por 5 min a máxima velocidad y se centrifugaron 15 min. Una vez más se transfirió el sobrenadante. Se adicionó el 70% del sobrenadante de alcohol isopropílico (alrededor de 280 μL) y se dejó precipitar en el congelador a -20°C toda la noche o mínimo por un periodo de 6 hrs. Seguir el formato de “Método de extracción de DNA1”.

5.3.5 Método de Extracción de DNA 3

Se centrifugó el tubo estéril de 1.5 mL con muestra de tejido obtenido después de la remoción de parafina y se eliminó el sobrenadante con una pipeta, evitando extraer el tejido junto con el líquido. Se agrega 10 μL de Proteinasa K Ambion® 20mg/mL y 300 μL de CTAB/PVP y se incubó a 55°C de 8 -12 hrs con agitación. Se aplicó choque térmico 95 °C por 5 min e inmediatamente a -75°C por 5 min y este procedimiento se repitió 4 veces con el fin de romper la pared de *Coccidioides spp.* Se agregó 10 μL de Proteinasa K Ambion® 20mg/mL y se incubó a 55°C de 8 -12 hrs con agitación. Se utilizó UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit de MO BIO Laboratories Inc. siguiendo el protocolo de fabrica con modificaciones menores como la temperatura de incubación fue de 65 °C por 20 min, agitándose en vortex por 15 s cada 5 min para finalmente concentrarse en 40 μL de la solución del kit.

Para comprobar la calidad y cantidad del producto de los tres tipos de extracciones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa de 1.4% y se agregó 3 μ L de producto y 1 μ L de azul de bromofenol 10X por un período de 20' a 80V. Se tiñó con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain y se observó el producto con lámpara de luz UV.

5.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Coccidioides* spp.

La identificación de la especie de *Coccidioides* se efectuó utilizando tres marcadores moleculares: gen *Ag2/PRA* (Bialek *et al.*, 2004), región Umeyama (Umeyama *et al.*, 2006) y nueve *loci* de microsatélites (Fisher *et al.*, 1999). En las tres amplificaciones de PCR se utilizó como control positivo la cepa M-38-05 de *C. immitis* analizada por Luna-Isaac (en prensa) y como control negativo se utilizó agua nanopura.

5.4.1 Amplificación del gen *Ag2/PRA*

El DNA genómico extraído del tejido FFPE fue amplificado mediante una PCR anidada utilizando el método descrito por Bialek *et al.* (2004). Los cebadores que se utilizaron para la región externa fueron: Cocci I (5'-GTACTATTAGGGAGGATAATCGTT-3') y Cocci II (5'-GGTGTCAACTGGTGGGATGTCAAT-3') obteniendo un producto de 526 pb. Los cebadores que se utilizaron para la región interna: Cocci III (5'-ATC CCA CCT TGC GCT GTA TGT TCG A-3') y Cocci IV (5'-GGAGACGGCTGGATTTTTTAACATG-3') obteniendo un producto de 342 pb.

Las condiciones de reacción para la región interna con un volumen final de 10 μ L fueron: 0.65 μ L de agua nanopura, 1.5 μ L de 10X Buffer Sigma, 3.0 μ L de dNTP's 1 mM, 0.9 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0.3 μ L de cada cebador a 10 μ M, 0.2 μ L de BSA, 0.15 μ L de Taq DNA Polimerasa (Sigma) 5U y 3 μ L de DNA genómico. El perfil de temperatura para la PCR consistió

de 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. Las condiciones de reacción para la región externa con un volumen final de 10 µL fueron: 1.65 µL de agua nanopura, 1.5 µL de Buffer Sigma 10X, 3.0 µL de dNTP's 1 mM, 0.9 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.3 µL de cada cebador a 10 µM, 0.2 µL de BSA, 0.15 µL de Taq DNA Polimerasa (Sigma) 5U y 2 µL de producto del PCR de la región externa. El perfil de temperatura para la PCR fue de 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min, 30 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. Se realizó electroforesis en gel de agarosa de 1.4% agregando 3 µL de producto del PCR y 1 µL de azul de bromofenol 10X por un período de 20 min a 80V. Se tiñó con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain y se observó el producto con lámpara de luz UV.

5.4.2 Región Umeyama

La región amplificada permite diferenciar entre la especie de *C. immitis* y *C. posadasii*, el producto amplificado para *C. immitis* corresponde a 720 pb y para *C. posadasii* de 632 pb. Los cebadores utilizados fueron: Coi9-1F (5'-TACGGTGTAATCCCGATACA-3') y Coi9-1R (5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3') diseñados por Umeyama (2006). Las condiciones de reacción para un volumen final de 25 µL son: 11 mM de Tris-HCl pH 8.4, 55 mM de KCl, 27.5 µg/mL de BSA, 1.0 mM de dNTP's, 0.3 µM de cada cebador, 1.55 µM de MgCl₂, 1.0 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) y 20 ng de DNA genómico. El perfil de temperatura para la PCR fue: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C x 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 45 s, finalizando con 1 ciclo de extensión a 72°C por 3 min. Se realizó electroforesis en gel de agarosa de 1.4% agregando 3 µL de producto y 1 µL de azul de bromofenol 10X por un período de 20 min a 80V. Se tiñó con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain y se observó el producto con lámpara de luz UV.

5.4.3 Purificación de productos amplificados

Los productos amplificados del gen *Ag2/PRA* y de la región Umeyama fueron purificados con ExoSAP-IT[®] (USB[®]), agregando 2 µL de esta solución por cada 5 µL de muestra. Posteriormente, se colocaron en el termociclador a un ciclo de 37°C por 15 min y 80°C por 15 min. Posteriormente, los productos purificados con ExoSAP-IT[®] se observaron en un gel de agarosa al 1.4% y se enviaron a secuenciar a SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) San Diego, California, EUA, utilizando el secuenciador automático ABI Prism 3100 (Automated Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems).

5.4.4 Análisis de las secuencias

Los cromatogramas de los productos amplificados del gen *Ag2/PRA* y de la región Umeyama se editaron con ChromasPro v1.5 (www.technelysium.com.au/chromas.html). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalX implementado en MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007). La identificación se realizó comparando con la secuencia de *C. posadasii*, cepa Silveira (No. de acceso AF013256) de 3823 pb y *C. immitis* el fragmento de PCR Ci45815 de Umeyama *et al.* (2006) (No. de acceso AB597180) de 718 pb. Los haplotipos para cada especie fueron determinados con el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009).

5.4.5 Análisis de microsatélites

El DNA genómico extraído fue genotipado utilizando los microsatélites polimórficos *GAC*, *621*, *GA37*, *GA1*, *ACJ*, *KO3*, *KO7*, *KO1* y *KO9* específicos para *Coccidioides spp.*, descritos por Fisher *et al.* (1999). *GAC* y *621* son dos microsatélites diagnósticos de *Coccidioides spp.* La reacción de PCR consistió de 11 mM de Tris-HCl pH=8.4, 55 mM de KCl, 27.5 µg/mL de BSA, 220 µM de dNTP's, 0.3 µM de cada cebador, 1.55 µM de MgCl₂, 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) y 20 ng

de DNA genómico en 25 µL de reacción. El perfil de temperatura para la PCR fue de un ciclo de desnaturalización a 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, de 52 a 64°C (dependiendo del cebador) por 30 s y 72°C por 45 s, finalizando con 1 ciclo de extensión a 72°C por 7 min (Fisher et al. 1999). Para determinar la cantidad y calidad de los productos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% agregando 3 µL de producto y 1 µL de azul de bromofenol 10X por un período de 20 min a 80V. Se tiñó con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain y se observó con lámpara luz UV.

5.5 ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO

5.5.1 Obtención de Datos

Los datos de las muestras de tejido FFPE de los pacientes estudiados se obtuvieron del Departamento de Patología del Hospital General de Tijuana, recabándose la siguiente información:

- a) Número de registro de muestra
- b) Edad del paciente
- c) Fecha de recepción de muestra
- d) Sexo
- e) Diagnóstico

5.5.2. Análisis de Datos

Los datos obtenidos fueron ordenados y analizados con el programa Microsoft Office Excel 2007. Los datos de edad fueron ordenados por rangos de la siguiente manera:

- Menores de 1 año de edad
- 1-5 años
- 6-10 años
- 11-20 años
- 21-30 años

- 31-50 años
- 51 años o mas
- ND = No hay datos

El diagnóstico histopatológico se clasificó de la siguiente manera.

- CM Cutánea
- CM Ganglionar
- CM Ósea
- CM Partes Blandas (músculo, tejido adiposo y tejido conectivo)
- CM Pulmonar
- CM Diseminada (se encontró en más de un solo tejido extrapulmonar)
- Otros = presentación de la enfermedad en alguna otra localización corporal fuera de las mencionadas

El sexo o género de los pacientes fueron abreviados M= Masculino y F= Femenino.

La relación entre el diagnóstico histológico y especie causal de CM se evaluó utilizando la prueba Chi^2 con la corrección de Yates de Chi^2 , en el programa STATISTICA 10. EL valor de significancia se estableció en $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 EXTRACCION DE DNA

El producto de la extracción de DNA obtenido con los tres métodos utilizados no fue visible en el gel de agarosa, algunas muestras mostraban una banda “barrida”, la cual es una característica de que el DNA de la muestra se encuentra degradado. Sin embargo, el DNA fue utilizado para realizar las amplificaciones de las tres regiones analizadas (*Ag2/PRA*, región Umeyama y microsatélites), siendo el método 3 de la extracción de DNA (UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit de MOBIO Laboratories Inc.), el que mostró los mejores productos de amplificación, por lo que se decidió seleccionar a este método para realizar todas las extracciones de DNA.

6.2 IDENTIFICACION MOLECULAR DE *Coccidioides spp.*

6.2.1 Amplificación y secuenciación del gen *Ag2/PRA*

Se logró amplificar el producto de 342 pb de la PCR anidada del gen *Ag2/PRA* en 109 muestras (84.5%), mientras que 20 muestras (15.5%) no amplificó este gen. De las 109 amplificadas y secuenciadas se descartaron 44 (40%), debido a que el cromatograma se mostraba sucio, mientras que 65 muestras (60%) presentaron un cromatograma claro, sin distorsiones, las cuales fueron analizadas. Las 65 secuencias seleccionadas fueron alineadas y comparadas con la secuencia de *C. posadasii* cepa Silveira (No. de acceso AF013256) y con la secuencia de *C. immitis* cepa M-38-05. Las 65 secuencias de este estudio se analizaron también con 123 secuencias obtenidas por Luna-Isaac (2010), de las cuales 24 corresponden a *C. immitis* (incluyendo la M38-05) y 99 a *C. posadasii*. Posterior a la alineación las 189 secuencias analizadas quedaron con una longitud de 251 pb. En total se detectaron nueve haplotipos, de los cuales tres corresponden a *C. immitis* (Hap01 – Hap03) y seis corresponden a *C. posadasii* (Hap04 – Hap 09). El 77% (146) de las 189 secuencias

analizadas pertenecen al haplotipo Hap04, el cual se alinea con la secuencia *C. posadasii* cepa Silveira (No. de acceso AF013256), el 100% de las secuencias reportadas como *C. posadasii* por Luna-Isaac (2010) y el 80% (65) de las 65 muestras analizadas en este estudio (Tabla 1, Anexo 1). El segundo haplotipo es el Hap01, el cual agrupa al 17% (35) de las todas las secuencias analizadas, incluyendo a la cepa cepa M-38-05 identificada como *C. immitis* (Luna-Isaac (2010), el 100% de las secuencias reportadas como *C. immitis* por Luna-Isaac (2010) muestras y el 17% (11) de las muestras de este estudio. El haplotipo Hap02 y Hap03, corresponden a *C. immitis* y son muestras de este estudio (FFPE-106, FFPE-27 y FFPE-127). (Tabla 1, Anexo 1). Los haplotipos Hap-05 al Hap-09, corresponden a *C. posadasii* y corresponden a muestras de este estudio (Hap-05: FFPE-110, FFPE-09, FFPE-29, FFPE-64; Hap-06: FFPE-44; Hap-07: FFPE-38; Hap-08: FFPE-62 y Hap-09: FFPE-118). (Tabla 1, Anexo 1).

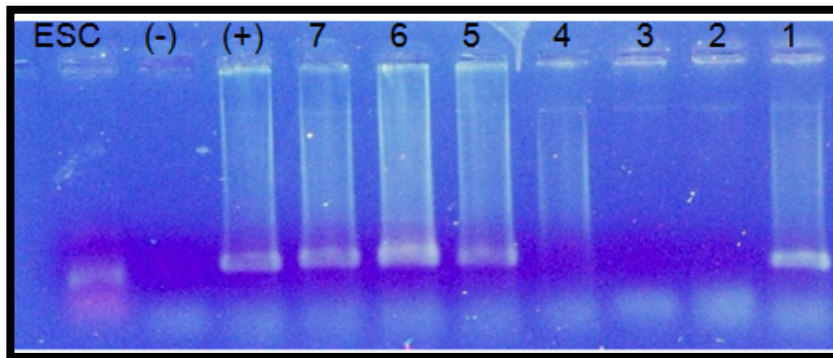


Figura 1. Amplificación de la región interna del gen *Ag2/PARA* de 342 pb. Electroforesis en gel de agarosa 1.4% a 80v por 20 min. 1-7: Muestras estudiadas, (+) control positivo M-38-05 (Luna-Isaac 2010). (-) Agua. E: escalera 430 pb.

Tabla 1. Haplotipos de *C. immitis* (Hap01 – Hap03) y *C. posadasii* (Hap04 – Hap09). Los nucleotidos en negritas muestran la mutacion con respecto a la secuencia concenso del Hap01. Existen 12 indels entre los haplotipos correspondientes de *C. immitis* y *C. posadasii*.

Secuencia			
Haplotipo	222222222233358911112 012345678901627601371 31134	Especie	Referencia
Hap01	-----AGCGGTATA		Este estudio y Jorge-Luna
Hap02	----- GG CGGTATA	<i>C. immitis</i>	Este estudio
Hap03	-----AGCGGT G TATA		Este estudio
Hap04	GTGGAACCTCACACCGGTATA		Este estudio y Jorge-Luna
Hap05	GTGGAACCTCACACTGGTATA		Este estudio
Hap06	GTGGAACCTCACACCGGTAT T	<i>C.</i>	Este estudio
Hap07	GTGGAACCTCACACCA AA TATA	<i>posadasii</i>	Este estudio
Hap08	GTGGAACCTCACACTGG G TATA		Este estudio
Hap09	GTGGAACCTCACACCGGT ACA		Este estudio

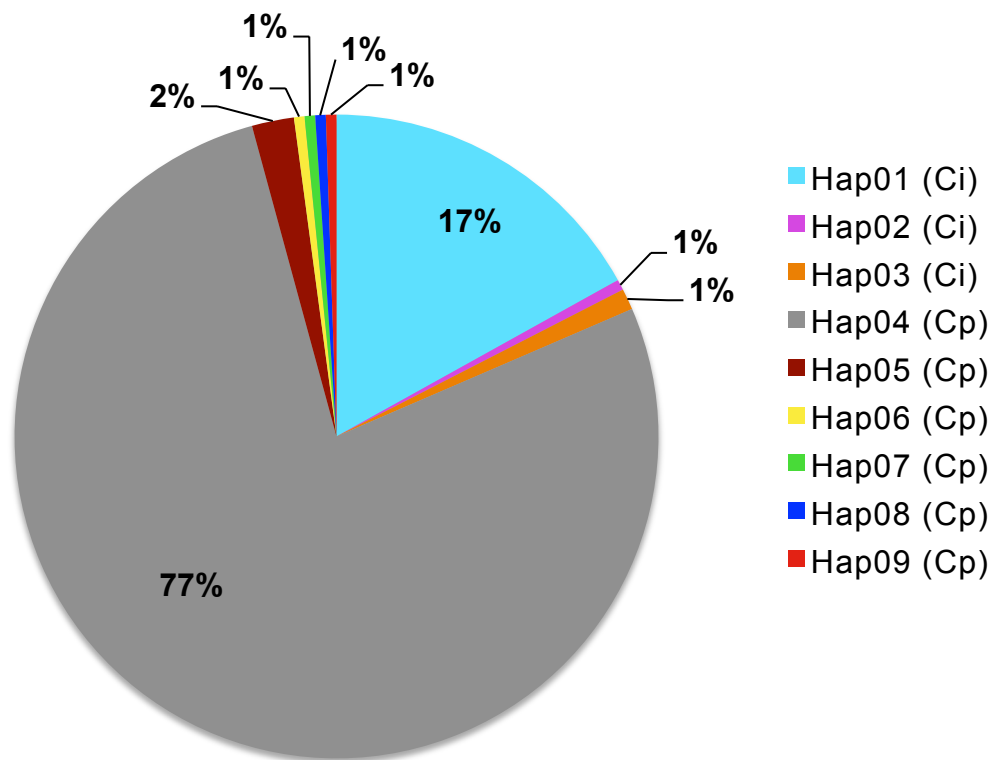


Figura 2. Porcentaje de haplotipos identificados en muestras clínicas identificadas molecularmente como *C. immitis* (Hap01 - Hap03) y como *C. posadasii* (Hap04 - Hap09).

6.2.2 Región Umeyama

No se tuvo éxito en la amplificación de la región Umeyama en ninguna de las muestras analizadas, a pesar de realizar diversas modificaciones al protocolo de la PCR, como realizar gradientes en la concentración de DNA, prolongar el ciclo de extensión de 3 a 5 min y un gradiente en la temperatura de hibridación. Es importante, mencionar, que en todos los casos, el DNA de las cepas de referencia (control positivo) amplificó con el protocolo original y en la mayor parte de las modificaciones.

6.2.3 Análisis de Microsatélites

No se tuvo éxito en la amplificación de los microsatélites en ninguna de las muestras analizadas, a pesar de realizar modificaciones al protocolo de la PCR, como realizar un gradiente en la concentración de DNA, prolongar el ciclo de extensión de 3 a 5 min y un gradiente en la temperatura de hibridación. Es importante, mencionar, que en todos los casos, el DNA de las cepas de referencia (control positivo) amplifico con el protocolo original y en la mayor parte de las modificaciones.

6.3 Análisis epidemiológico de las muestras en relación con *Coccidioides spp.*

6.3.1 Frecuencia de las localizaciones de CM.

El principal diagnóstico registrado en las 128 muestras FFPE analizadas fue el de CM Cutánea correspondiendo al 20% (26 casos). En segundo lugar con el 18.4% (23 casos), se encuentra la categoría de "otros", el cual incluye casos localizados en tejido sinovial, vaginal, hepático, entre otros, que son 23 casos (18.4%). CM Ganglionar y Pulmonar representan el 17% (22 casos) cada una. CM Ósea 15.3% (19 casos), CM Partes Blandas 10.8% (14 casos) y CM Diseminada 1.5% (2 casos).

6.3.2 Relación de la especie *C. posadasii* y *C. immitis* con diagnóstico histopatológico

El principal diagnóstico de las muestras identificadas con *C. posadasii* fue CM Cutánea con 11 casos (20.4%) y el menor número de casos fue para CM Partes Blandas (11.1%). En cuanto a *C. immitis*, el diagnóstico predominante fue CM clasificada como “otros” con 4 casos (36.3%) (Figura 4). El análisis para determinar si existe relación entre la especie y el diagnóstico histopatológico fue no significativo al utilizar las pruebas de χ^2 sin y con corrección de Yates ($P = 0.9787$ y $P = 0.6883$, respectivamente).

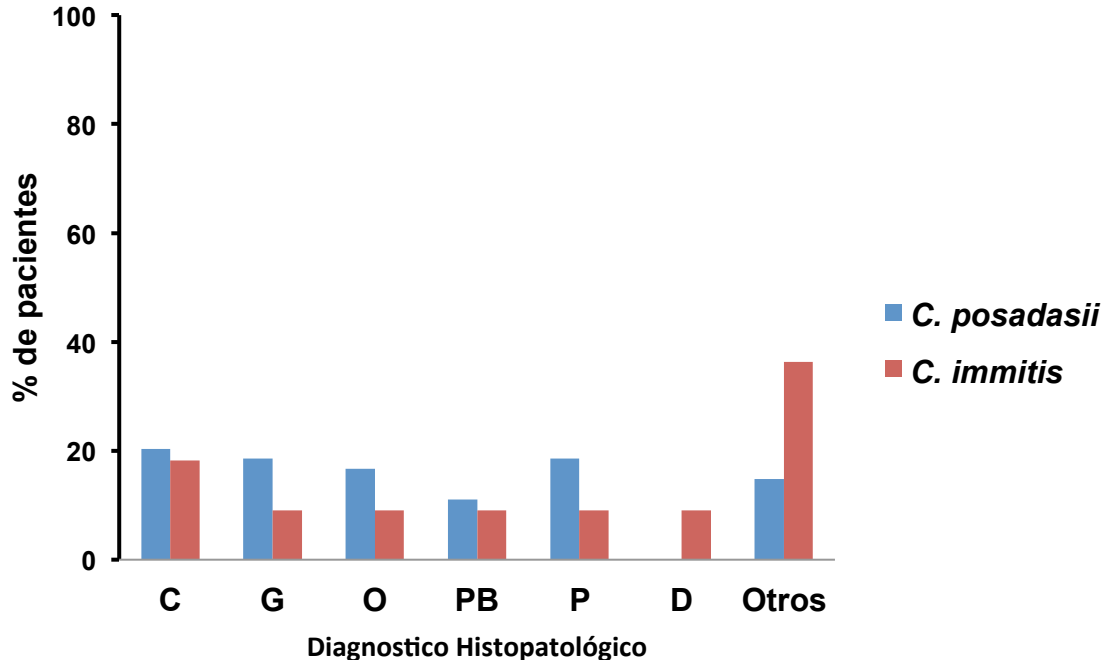


Figura 4. Relación de *C. posadasii* y *C. immitis* con el tipo de diagnóstico histopatológico de CM. C = cutánea, G= ganglionar, O = ósea, PB = partes blandas, P= pulmonar, D = diseminada.

6.3.4 Relación del género en los pacientes de las muestras estudiadas y con *C. posadasii* y *C. immitis*

El género predominante de los 128 casos estudiados fue el masculino (M) con el 70.7% (90 casos) y el género femenino (F) representó el 29.3% (38 casos). Los individuos M infectados a los cuales se les identificó la especie causal de CM suman un total de 46 casos, los individuos F suman un total de 19 casos. Los individuos M infectados por *C. posadasii* representan el 85% (39 casos) y los infectados por *C. immitis* 15% (7 casos). Los individuos F infectados por *C. posadasii* representan el 79% (15 casos) y los infectados por *C. immitis* son el 21% (4 casos) (Fig. 5).

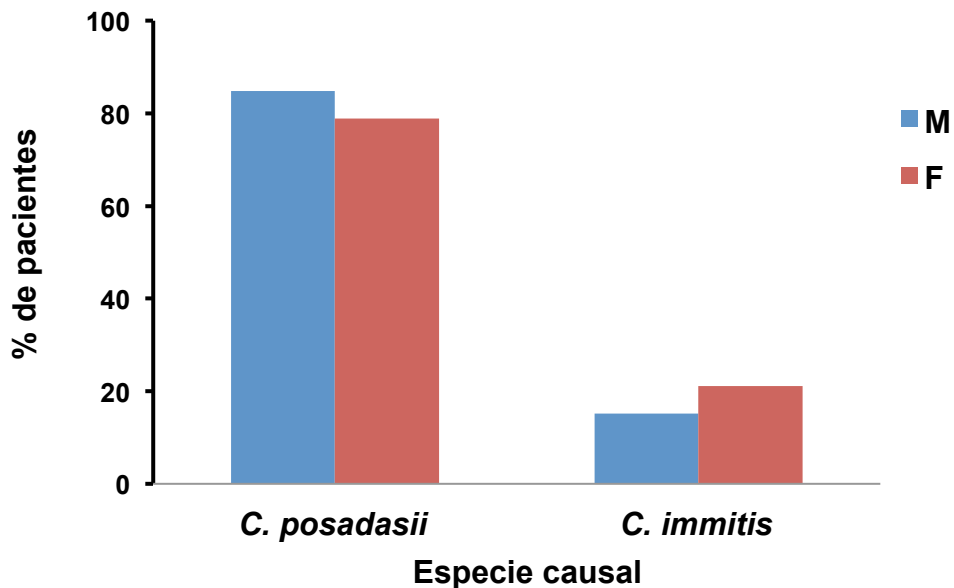


Figura 5.. Relación del género de pacientes estudiados con la especie causal de CM. M = género masculino, F = género femenino

6.4.5 Rangos de edad de los pacientes de las muestras analizadas

Los pacientes presentaron edades entre los 2-83 años (89%) y 7 pacientes (11%) cuya edad se desconocía. La edad media de los pacientes de las muestras estudiadas fue de 26.3 años, afectando principalmente aquellos grupos de edad mayor de 20 años (68%) (Figura 6). El 66.7% (36 casos) de los pacientes afectados por *C. posadasii* son mayores de 21 años de edad y los afectados por *C. immitis* dentro de este mismo rango de edad fueron 8 (72.8%).

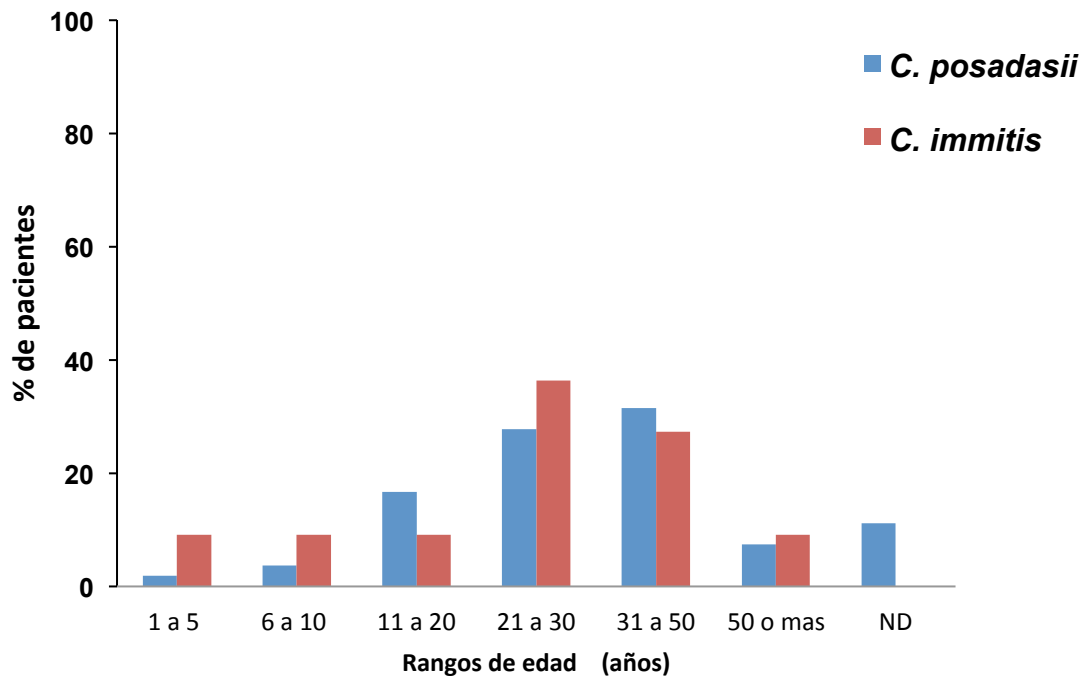


Figura 6. Edad de pacientes infectados por *C. immitis* o *C. posadasii*

7. DISCUSION

Se logró identificar la presencia de *Coccidioides spp.* en 65 muestras FFPE de pacientes diagnosticados con CM del H.G. de Tijuana en el periodo de 1982-2010 utilizando la secuencia del gen *Ag2/PRA*. Con este método se logró amplificar el 84.5% de las 129 muestra analizadas en este estudio, confirmando el diagnóstico histopatológico de CM. En el 15.5% restante no se observo fragmento amplificado esperado en el gel de agarosa. Existen dos posibles razones por las cuales la amplificación falló, la primera puede ser debido a la degradación del DNA del tejido al ser procesada con formaldehido para realizar el bloque histopatologico embebido en parafina; la segunda, se refiere a que solo se utilizo una porcion del del bloque de parafina (8-10 cortes de 60 µm), por lo que existe la posibilidad de que los cortes utilizados no tenían células del hongo. Sin embargo, debido a que no se observó al microscopio para determinar si el corte llevaba o no células del hongo, no se puede confirmar a que ésta sea la principal causa. Por lo tanto, es de gran importancia, confirmar microscópicamente, si los cortes llevan tejido previo a realizar la extraccion de DNA. Con respecto a la amplificacion de los microsatelites (Fisher *et al.* (2002) no se lograron amplificar, lo cual concuerda con lo reportado por Bialek *et al.* (2004) quien logró amplificar tres muestras de tejido FFPE con diagnóstico de CM utilizando la secuencia del gen *Ag2/PRA* y sin éxito al utilizar los microsatélites.

La especie predominante en este estudio fue *C. posadasii* (83%, 54 muestras), el 17% restante (11 muestras) correspondió a *C. immitis*. Estos resultados concuerdan con Luna-Isaac (2010) quien reporta la presencia de *C. posadasii* en regiones de México no consideradas como endémicas. Fisher et. al. (2002) reporta que *C. immitis* se limita geográficamente a la región del Valle de San Joaquín en California, EUA, mientras que *C. posadasii* se localiza en el resto de las áreas semiáridas del sureste de

Estados Unidos, norte de México, Centro y Sudamerica, por lo que estas especies se comportan de forma alopátrica, sin embargo, indica que para la región del sur de California y en México, existen zonas de simpatría, en donde ambas especies cohabitan. Esto concuerda con lo reportado por Luna-Isaac (2010) quien al analizar muestras clínicas de pacientes de origen mexicano, reportó la presencia de *C. immitis* y *C. posadasii* fuera de la ubicación geográfica mencionada por Fisher *et al.* (2002). Desafortunadamente, para este estudio, no se conto con la informacion del lugar de nacimiento y de residencia de los pacientes, por lo que, no se puede realizar algun tipo de inferencia para poder determinar el flujo migratorio de las cepas.

En las secuencias obtenidas de las muestras FFPE se lograron identificar tres haplotipos de *C. immitis* y seis de *C. posadasii*. Luna-Isaac (2010) utilizando las secuencias obtenidas con el método de Ag2/PRA y los cebadores Coi9 (Bialek *et al.* 2004; Umeyama *et al.* 2006) reportó 11 haplotipos de *C. posadasii* y cuatro de *C. immitis*. Luna-Isaac (2010) reportó que la región con mayor variedad de haplotipos en México es Baja California y del total de haplotipos de *C. immitis*, uno es exclusivo de esta región. En cuanto a *C. posadasii*, Luna-Isaac (2010) reporta 5 haplotipos, y también uno es exclusivo de Baja California.

Al analizar y agrupar las secuencias de Luna-Isaac (2010) con las obtenidas en éste estudio, éstas se agruparon en seis haplotipos de *C. posadasii* y tres de *C. immitis*. Todas las muestras de *C. immitis* de Luna-Isaac (2010) se agruparon en el haplotipo Hap01, y las de *C. posadasii* de Luna-Isaac (2012) se agruparon en el haplotipo Hap04. Sin embargo, en este estudio se reportan dos nuevos haplotipos (Hap02 y Hap03) para *C. immitis* y cinco nuevos haplotipos para *C. posadasii* (Hap05 al Hap09). Esto es de gran importancia, debido a que se observa diversidad genética

en esta especie, sin embargo, como se menciono anteriormente, al no contar con la informacion del lugar de nacimiento y de residencia de los pacientes, no se pueden realizar mas inferencias. Es por esta, razón que es crítico que el medico tratante tome este tipo de datos en el momento de la consulta, lo que permitirá realizar más analisis que permitan concluir el patron de dispersión del hongo.

En este estudio también se relacionaron las especies *Coccidioides* con la presentación clínica de CM, pero se concluye que no la hay ($P= 0.9787$), aunque las muestras con presencia de *C. immitis* fueron, en su mayoría (92%) muestras extrapulmonares. En el caso de muestras con *C. posadasii* el 70% fueron extrapulmonares. Estos datos son parecidos a los reportados por Luna-Isaac (2010) donde menciona que *C. immitis* se presentaba de manera diseminada. La intención de relacionar alguna especie con la manera en la que se presenta la CM ha fracasado en otros estudios, todos indicando que diversos factores del huésped predisponen la enfermedad. Algunos autores como Jewell *et al.* (2008) mencionan que no hay cepas con mayor virulencia de este hongo, sino que la presentación de CM depende más del huésped.

En cuanto a la distribución del género de los pacientes con CM, el sexo masculino fue el más afectado por cualquiera de las dos especies una relación de 4:1 del género femenino, lo que concuerda con otros trabajos (Calderon-Garcidueñas *et al.* 2004; Laniado-Laborin 2007) En este estudio no se encontró una relación entre el género y la manifestación clínica de CM, a pesar de que autores como Drutz *et al.* (1981) refieren que la presencia de las hormonas sexuales, aumentan el riesgo de presentar una forma más severa de CM en el organismo.

Los datos de edad de los pacientes reportan un aumento de número de casos en edades superiores a los 21 años. En el caso de los individuos masculino y en el caso de femenino se mantienen en un promedio de 7 casos en los rangos de edad mencionados después de los 21 años. En trabajos anteriores se ha publicado que la CM se presenta a cualquier edad, aumentando el número de casos a medida que el individuo adquiere más edad y las complicaciones se presentan con mayor frecuencia en los extremos de la vida (Laniado-Laborin 2007) por lo que los resultados concuerdan en este aspecto. En EUA se reportan mayor cantidad de CM entre los rangos edad de 30-75 años (Saubolle *et al.* 2007), en este estudio sucede lo mismo, aunque en los pacientes que se conocía la edad, los individuos menores de 30 años fueron ligeramente una mayor cantidad (30 casos) que los individuos de 30 años o más (28 casos).

Es importante mencionar que hasta el momento no se había realizado un reporte de 129 casos histopatológicos de CM en México, el más extenso fue reportado por Calderon-Gracidueñas (2004) donde analizando muestras histopatológicas de más de 4500 autopsias, se registraron 31 casos de CM en el periodo de 1983-2000, pero no realizaron análisis molecular de las muestras. Otros autores como Bialek *et al.* (2004) utilizó 3 muestras de tejido FFPE y Binnicker *et al.* (2007) utilizó 148 muestras histopatológicas para estudios moleculares de *Coccidioides spp.*, pero ellos solamente identificaron la presencia del hongo, sin realizar un análisis de las secuencias obtenidas.

8. CONCLUSIONES

1. La especie predominante en 65 pacientes diagnosticados con CM en el período de 1982 a 2010 en Baja California fue *C. posadasii*.
2. La técnica PCR anidada diseñada por Bialek *et al.* en 2004 probó ser la única que funcionó amplificando el DNA fúngico a partir de tejidos FFPE.
3. La mayoría de los casos de CM identificados molecularmente por ambas fueron de tipo extrapulmonar.
4. No hay correlación significativa entre la presentación clínica de CM y las especies *C. immitis* y *C. posadasii*.

9. LITERATURA CITADA

- Ajello L (1956) Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science*
- Ajello L (1967) Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. *Bacteriological Reviews* 31: 6-24
- Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR (1995) Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques* 18
- Baptista-Rosas R, Riquelme-Pérez M, Muñiz-Salazar R, Becuar-González C, Arredondo-Ozuna C, Fernández-Garza D, Catalan-Dibene J, Zimbrón-Hernández M, Salas-Vargas S, Meza A (2009) Seroprevalencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp. en pacientes con diagnostico clinico inicial de tuberculosis en Ensenada, B. C. *Bioquimia* 34: 100
- Baptista-Rosas RC, Riquelme M (2007) Epidemiología de la Coccidioidomycosis en México. *Rev Iberoam Micol* 24: 100-005
- Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S (1998) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2413–2418
- 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
- Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfel SL, Wengenack NL (2007) Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 173-178
- Binnicker MJ, Popa AS, Catania J, Alexov M, Tsaras G, Lloyd F, Wengenack NL, Enzler MJ (2011) Meningeal coccidioidomycosis diagnosed by real-time polymerase chain reaction analysis of cerebrospinal fluid. *Mycopathologia* 171: 285-289

- Blair JE (2009) Coccidioidal meningitis: update on epidemiology, clinical features, diagnosis, and management. *Current Infectious Disease Reports* 11: 289-295
- Buiuc D, Dobrescu A, Dobrescu G, Petrescu Z, Brănișteanu L (1990) Further comment on the importance of microscopy in clinical microbiology. The argument for the diagnosis of the skin manifestations of histoplasmosis and coccidioidomycosis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 94: 393-396
- Burgueño-Duarte V (1997) Aislamiento de *Coccidioides immitis* en muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de tuberculosis pulmonar en la ciudad de Tijuana, Baja California. Tesis de la Universidad Autónoma de Baja California
- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW (1996) Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis* (population genetics/clonality/recombination/single-strand conformation polymorphism/sequencing with arbitrary primer pairs). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 770-773
- Calderon-Garcidueñas AL, Piña-Osuna K, Leal-Moreno AM, López-Cárdenas A, Cerda-Flores RM (2004) Características clinicopatológicas y distribución del número de autopsias de pacientes fallecidos por coccidioidomicosis en un hospital de referencia del noreste de México. *Gaceta Médica de México* 140
- Cano-Rangel MA, Dorame-Castillo R, Gómez-Rivera N, Contreras-Soto J (2006) Coccidioidomicosis diseminada con afección de nódulos linfáticos: experiencia en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (1983-2004). *Bol Clin Hosp Infant Edo Son* 23: 10-14
- Castañeda-Godoy R, Laniado-Laborin R (2002) Coexistencia de TB y coccidioidomicosis. Presentación de dos casos clínicos. *REV INST NAL ENF RESP MEX* 15: 98-101

- Castañon-Olivares LR, Aroch-Calderon A, Bazan-Mora E, Cordova-Martinez E (2004) Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 47
- Castañón LR, Guereña D, González MR, Licea AF, González GM, Aroch A (2007) Molecular identification of *Coccidioides* isolates from mexican patients. *Ann N Y Acad Sci* 1111: 326-335
- Centers of Disease Control and Prevention C (2001) Public health dispatch: Coccidioidomycosis.- among persons attending the World Championship of model Airplane Flyng.- Kern County MMWR Morb Mortal Wkly Rep, California October 2001, pp 1106-1107
- Chiller TM, Galgiani JN, Stevens DA (2003) Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 17: 41-57
- Collins CH, Grange JM (1999) Tuberculosis acquired in laboratories and necropsy rooms. *Communicable Disease and Public Health* 2
- Coombs N, Gough A, Primrose J (1999) Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research* 27
- Crum NF, Lederman ER, Stafford CM, Parrish JS, Wallace MR (2004) Coccidioidomycosis: a descriptive survey of a reemerging disease. Clinical characteristics and current controversies. *Medicine (Baltimore)* 83: 149-175
- de Aguiar Cordeiro R, Nogueira Brilhante RS, Gadelha Rocha MF, Araújo Moura FE, Pires de Camargo Z, Costa Sidrim JJ (2007) Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. *Clinical Microbiology and Infection* 449–451
- de Lamballerie X, Chapel F, Vignoli C, Zandotti C (1994) Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. *Journal of Clinical Pathology* 47
- Dickinson F (2004) Ecología Humana en Mexico. Una Frontera con (casi) todo por hacer. *Avance y Perspectiva* 23: 5-11

- DiTomasso JP, Ampel NM, Sobonya RE, Bloom JW (1994) Bronchoscopic diagnosis of pulmonary coccidioidomycosis comparison of cytology, culture, and transbronchial biopsy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 18: 83-87
- Dixon DM (2001) *Coccidioides immitis* as a select agent of bioterrorism. *Journal of Applied Microbiology* 91: 602-605
- Drutz DJ, Huppert M, Sun SH, McGuire WL (1981) Human Sex Hormones Stimulate the Growth and Maturation of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 32
- Durkin M, Connolly P, Kuberski T, Myers R, Kubak BM, Bruckner D, Pegues D, Wheat LJ (2008) Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. *Clinical Infectious Diseases* 47: 69-73
- Fernández-Cuenca F (2004) Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecciosas Microbiologia Clinica* 22: 355-360
- Fiese MJ, Cheu S, Sorensen RH (1955) Mycelial forms of *Coccidioides immitis* in sputum in tissues of the human host. *Annals of Internal Medicine* 43: 255-270
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW (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
- Gaidici A, Saubolle MA (2009) Transmission of Coccidioidomycosis to a Human via a Cat Bite. *Journal of Clinical Microbiology* 47
- Galgiani JN (1993) Coccidioidomycosis. *The Western Journal of Medicine*: 153-171

- Galgiani JN, Ampel NM, Blair JE, Catanzaro A, Johnson RH, Stevens DA, Williams PL (2005) Coccidioidomycosis. *CID* 41: 1219-1223
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985) Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130: 118-126
- Gromadzki SG, Chaturvedi V (2000) Limitation of the AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test: false-negative results with formaldehyde-killed cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2427-2428
- 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
- Janis EB, Currier JT (2008) Significance of isolated positive IgM serologic results by enzyme immunoassay for coccidioidomycosis. *Mycopathologia* 166: 77-82
- Jewell K, Cheshier R, Cage GD (2008) Genetic diversity among clinical *Coccidioides spp.* isolates in Arizona. *Medical Mycology* 46: 449-455
- Johnson SM, Pappagianis D (1992) The coccidioidal complement fixation and immunodiffusion-complement fixation antigen is a chitinase. *Infection and Immunity* 60: 2588–2592
- Kaufman L, Standard PG, Huppert M, Pappagianis D (1982) Comparison and diagnostic value of the coccidioidin heat-stable (HS and tube precipitin) antigens in immunodiffusion. *Journal of Clinical Microbiology* 22: 515-518
- Kirkland TN, Fierer J (1996) Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerging Infectious Diseases* 3
- Kolivras KN, Comrie AC (2003) Modeling valley fever (coccidioidomycosis) incidence on the basis of climate conditions. *Int J Biometeorol* 47 87–101

- Laniado-Laborin R (2007) Expanding understanding of epidemiology of *Coccidioides* in the western hemisphere. *Ann N Y Acad Sci* 1111: 19–34
- Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas N, Lopez-Espinoza G (1997) Prevalence and annual risk of tuberculosis infection in Mexico. *Am J Respir Crit Care Med* 155
- Laniado-Laborin R, Cardenas-Moreno R, Alvarez-Cerro M (1991) Tijuana: zona endémica de infección por *Coccidioides immitis* *Salud Publica de Mexico* 33
- Lefler E, Weiler-Ravell D, Merzbach D, Ben-Izhak O, Anson Best L (1992) Traveller's coccidioidomycosis: case report of pulmonary infection diagnosed in Israel. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 1304-1306
- Levan NE (1954) Occupational aspects of coccidioidomycosis. *California Medicine* 80
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Luna-Isaac J (2010) Análisis genético de *Coccidioides posadasii* y *C. immitis* en México. Tesis de Maestria
- Lunel FV, Licciardello L, Stefani S, Verbrugh HA, Melchers WJ, Meis JF, Scherer S, van Belkum A (1998) Lack of consistent short sequence repeat polymorphisms in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. *Journal of Bacteriology* 180: 3771–3778
- Merriam CH, Steineger L (1890) Results of a biological survey of the San Francisco mountain region and the desert of the Little Colorado, Arizona. *North American Fauna Report* 3. U.S. Department of Agriculture, Division of Ornithology and Mammalia, Washington, D.C.: 136

- Muñoz B, Castañón LR, Calderón I, Vázquez ME, Manjarrez ME (2004) Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in mexican patients. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1247
- Negrón R (2008) Evolución de los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la Coccidioidomycosis en las Américas. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 246-256
- Overholt EL, Hornick RB (1964) Primary Cutaneous Coccidioidomycosis. *Arch Intern Med.* 114: 149-153
- Pappagianis D, Zimmer BL (1990) Serology of coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 247-268
- Posadas A (1892) Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. *Circulo Medico Argentino* 15: 585–597
- Puckett TF (1954) Hyphae of *Coccidioides immitis* in tissues of the human host. *American review of Tuberculosis* 70: 320-327
- Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D (2007) Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 26-30
- Sobonya RE, Barbee RA, Wiens J, Trego D (1990) Detection of Fungi and Other Pathogens in Immunocompromised Patients by Bronchoalveolar Lavage in an Area Endemic for Coccidioidomycosis. *Chest* 97: 1349-1355
- Spivey CG, Jones FL, Bopp RK (1969) Cavitory coccidioidomycosis: experience in a tuberculosis hospital outside the endemic area. *Dis Chest* 56: 13-18
- Stein HF (1953) Coexisting pulmonary coccidioidomycosis and TB. *Am Rev TB* 67: 477-489.
- Stevens DA (1995) Current concepts: Coccidioidomycosis. *New England Journal of Medicine* 332: 1077-1082
- Swatek FE (1970) Ecology of *Coccidioides immitis*. *Mycopathol Mycol App* 40: 3-12

- 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
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1859-1862
- Vucicevic D, Blair JE, Binnicker MJ, McCullough AE, Kusne S, Vikram HR, Parish JM, Wengenack NL (2010) The Utility of *Coccidioides* Polymerase Chain Reaction Testing in the Clinical Setting. *Mycopathologia* 170: 345-351
- Wang Z-y, Wen S-l, Ying K-j (2011) A case study of imported pulmonary coccidioidomycosis. *J Zhejiang Univ-Science B (Biomed and Biotechnol)* 12: 298-302
- Zepeda MR, Kobayashi GK, Appleman MD, Navarro A (1998) *Coccidioides immitis* presenting as a hyphal form in cerebrospinal fluid. *Journal of the National Medical Association* 90