

Universidad Nacional de San Martín
Maestría en Microbiología Molecular



**Caracterización de cepas de *Coccidioides*
spp. circulantes en la República Argentina**

Maestrando
Lic. Andrea Nora Motter

Director
Dr. Roberto Osvaldo Suárez Alvarez

Co-Directora
Dra. Cristina Elena Canteros

Unidad Operativa Centro de Contención Biológica
UOCCB-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Dto. Micología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Agosto 2018

a Chita y al Viejo

...“Siempre podremos encontrarnos en los jardines de la memoria, en el palacio de los sueños”...

(Linda Woolverton, Alicia a través del espejo)

A la ANLIS-“Dr Carlos G Malbran” y a la Universidad de San Martín que hicieron posible la cursada y realización de esta Tesis de Maestría en mi lugar de trabajo.

Al Dr Roberto Suárez-Alvarez, por haber dirigido esta tesis, por la paciencia y la dedicación en todas y cada una de las correcciones y en el intercambio de ideas, pero por sobre todas las cosas por tu calidad de ser humano. Tuve la suerte de encontrar en vos una persona a quien admirar y querer al mismo tiempo...Gracias por haber estado siempre, a nivel profesional, personal y laboral; por las charlas y por los abrazos... Sos lo más “socio”

A la Dra Cristina Canteros, uff que difícil Cris...primero agradecerte por poder trabajar con y para tu Servicio...te admiro profundamente y agradezco todos y cada uno de los desafíos que me impusiste, por tu generosidad al momento de la realización y elección del tema de este trabajo, por haberlo codirigido, por las largas charlas y discusiones y por tu “deporte favorito”...todavía recuerdo nuestro primer encuentro y, a la distancia, agradezco que fuera de esas cosas que “cambian rumbos”.

Al Dr Alexis Edelstein, por darme la oportunidad de trabajar en la UOCCB y, con ello, desarrollar parte de este trabajo. Sin tu apoyo, confianza y “sponsoreo” no hubiera sido posible.

A la Dra Graciela Davel, quien me abrió las puertas del Departamento Micología y me hizo sentir una más, gracias por tus consejos y tus críticas siempre constructivas...todo me sirvió para crecer...

A la UOCCB, lugar donde desarrollé parte de este trabajo y a mis compañeros, especialmente a Leo N. y Flor por hacerlas “trabajar en domingo”, a Adri por acompañar siempre, a Car y Jaz, “mis mamuchas” incondicionales que me padecieron y soportaron toda la Tesis, a Nadia, Juan, a los “BS”: Augusto, Vani, Sebas, a Charly por tantos “programas”, a Sole por “pelearme”, a Lula, Ariel, Mochi, Damián y Mariela. A los **UTN** que todo lo arreglan.

Al Departamento Micología, donde pude realizar gran parte de mi trabajo, por abrirme las puertas en todos los Servicios e independientemente del tema por darme siempre una mano, todos en mayor o menor medida han contribuido a este trabajo:

Javi, Rocío, Eli, Nadia, a Coty y sus consejos y ayuda para con los “DNAses”, a Susana, Guille y Marianita, a Cristinita, Bárbara y Matías por sacarme de más de un apuro, “a los Miceliales”: a Alejandra por su paciencia, a Nico por la confianza, al Negro por tooodas sus explicaciones y a Juli por ayudarme en todo lo que pudo...mis árboles no serían tan lindos sin tu ayuda...como los discutimos!!!

“A Micosis Profundas”: a Ceci -sororidad de la esférula- por compartir sus “Cocci con los materiales y métodos incluidos”, a Flavia por estar dispuesta a ayudar siempre y a Mariana V.

“A los TT”: Meibl, Walter y Wanda (amiguiiiiiss) por compartir mis “horas más largas” y ponerle toda la energía y una taza de café.

A Adri, por tu complicidad, ayuda, paciencia -sobre todo- y por la confianza que depositaste en mí. Gracias por todo eso!!!

A Dami por los abrazos, las canciones, por ser el par de manos que más de una vez me faltó para los geles y por tu memorable frase “8 de cada 9 secuencias prefieren el protocolo de Andy”

Al Servicio de Neurovirosis, por las secuenciaciones

A los chicos de Parasito TT, especialmente a Rocío, Ignacio, Marta y Claudia, con quienes comparto más que el curso de epidemiología

A mis amigos, Andre (que lejos quedó el Jardín de Infantes y que hermosa familia formaste con Ariel! Luka y Ernes), Lolo Rodríguez, Claudia Carrizo con mi ahijada Luli, Juan y Pablo incluidos, a los “Mc recuperados” a San “LaPoio” por tantas charlas y audios que gracias a la tecnología nos hace estar más cerca que 14000 kms, a Vladi y sus flores, Diego F. y Eleo. A Deby y Vanesa Bastin, quien apareció como un pilar en mi peor momento...gracias por tanto y por estar siempre...vos sabes...

A la Dra Laura Todaro, Kari! gracias por tanta ayuda y tanta confianza...sos una gran persona y excelente profesional sabes cuánto te admiro y quiero, y al **Dr. Alejandro Urtreger** por su calidad profesional y su ayuda en "tiempos del Roffo". Al **Dr. Guillermo Peluffo** por todo (hospedaje de "peregrino" incluido)

A la Dra Maria Leonor Cantore, sin tu paciencia, tu ayuda, y tu calidad de persona, docente e investigadora no hubiera llegado hasta acá...gracias por haberme "guardado el tema un año"...y como era de esperar, por la lectura final de este manuscrito...

A mis afectos, gente que se ha cruzado en mi camino y ha marcado "la diferencia": Caro y "los Manganelli", Lola Moreno, Ana Laura Salinas y su bondad sin límites y a Fer Estraviz. A Fernando Ch, Caty Lodi, Lili V, Marina S, Vanina R, Elisa B, Danka K, Alicia R, Romina K y mis ex-compañeros del Instituto Roffo, con quienes compartí mis primeros pasos post-recibida y de quienes aprendí mucho.

A mi familia, los primos "Nestor y Dina", la tía Mauschen y sus "sábados de té", a Dieguitus y mis sobrinos postizos Matu, Ro y Nachis, al **Tio Coco** y "nuestros retiros espirituales" en tu casa del "Huechu" tus charlas me llevan a los 70' y a la adolescencia de los viejos...Gracias por mantener vivos esos recuerdos... A "la Negrita Ana". Al **Tío Víctor**, a su memoria, al recuerdo de mi primer juego de química y las vacaciones. Al recuerdo del **Tío Ruben** y la **Abuela Dominga**.

A los "peludos", quienes con su amor incondicional alegran "cualquier mal día"

A Mariana, mi hermana...mi mejor mitad, por compartirlo todo, por tu apoyo incondicional, por tus abrazos, tus besos, tu confianza, por "nuestra canción", nuestras promesas y por "hacer de hermana mayor"...agradecerle a la Dios por tenerte y por haberme hecho el mejor regalo **Delfi** que cambió mi nombre y me mostró la magia que guarda un dibujo, un color, una canción y una pijamada juntas.

A Rober "el papu", por la vida que estamos compartiendo y que me hace muy feliz, por ser un gran compañero de ruta, por bancarme en todas, ayudarme, apoyarme, bancar mis horarios, mis rabetas y mis cansancios...Gracias por tanto amor, tu sensibilidad única, tu paciencia infinita y por "Kuki", "Don Roberto" y el "tío Pepe"

Al viejo, un luchador de verdad, hasta el último día, un ejemplo de honestidad, trabajo y bondad...un enamorado de la patria y de los ideales...gracias por transmitirme esa pasión...te fuiste muy pronto, pero tuvimos un tiempito para despedirnos e ir a "nuestra última Plaza"...

A Chita, porque tu fuerza, tu lucha y tu empuje me van a acompañar siempre. Sos mi ejemplo de perseverancia y por eso llegué hasta acá y por eso voy a seguir más allá... eso es lo que me pedirías. Te fuiste muy pronto y sin despedirte...todavía te sueño...todavía te extraño...

*Finalmente....A Dios por la vida, a la **Biología** por "enamorarme", a la **Universidad de Belgrano** por formarme, a la **Universidad de Buenos Aires**, Facultad de Agronomía y Medicina por capacitarme y a la "**Micología**" por darle sentido a todo lo anterior...*

Andre

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
<i>Coccidioides</i>	5
• Características.....	5
• Ecología.....	6
Ciclo de vida e infección.....	8
Historia de la Coccidioidomicosis.....	10
Cuadro clínico y manifestaciones de la Coccidioidomicosis.....	12
• Clasificación y cuadro clínico.....	13
Epidemiología.....	15
Diagnóstico de la Coccidioidomicosis.....	17
• Examen directo.....	18
• Histología.....	18
• Cultivo.....	19
• Pruebas inmunológicas: detección de antígenos y anticuerpos.....	20
• Diagnóstico molecular.....	21
Identificación de especies y caracterización genética.....	21
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Microorganismos.....	27
Identificación fenotípica.....	28
• Características macroscópicas de la fase M.....	28
• Características microscópicas de la fase M.....	28
• Conversión de la Fase Micelial (M) a Parasítica (P).....	28
• Producción y detección de exoantígeno.....	28
Caracterización genética.....	30
• Extracción del ADN y determinación de su concentración.....	30
• Amplificación del fragmento del gen <i>Ag2/PRA</i>	31
• Amplificación de la región ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2).....	32
• Purificación de productos de PCR.....	34
• Secuenciación y análisis.....	34

RESULTADOS.....	37
Microorganismos.....	37
Identificación fenotípica.....	40
• Características macroscópicas de la fase M.....	40
• Características microscópicas de la fase M.....	41
• Conversión de la Fase Micelial (M) a Parasítica (P).....	42
• Producción de exoantígeno.....	43
Caracterización genética.....	44
• Extracción de ADN y determinación de su concentración.....	44
• Amplificación del fragmento del gen <i>Ag2/PRA</i>	45
• Amplificación de la región ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2).....	46
• Secuenciación y análisis.....	47
DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES.....	67
PERSPECTIVAS A CORTO PLAZO.....	69
ANEXO: Medios de cultivo, soluciones y materiales.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	73

RESUMEN

Coccidioides es un género de hongos dimorfos, agentes causales de la coccidioidomycosis (CDM). A pesar de su restricción a las regiones geográficas áridas y semiáridas del continente Americano, esta micosis desatendida tiene un impacto sustancial en la salud pública. En los últimos veinte años se ha observado un aumento en la incidencia de la enfermedad e inclusive se han descrito nuevas áreas endémicas.

El género *Coccidioides* está compuesto por dos especies solo identificables por métodos moleculares: *C. immitis*, restringido a California, EE.UU. y estados aledaños, y *C. posadasii* en todas las Américas.

En Argentina, las regiones precordilleranas norte y central poseen las características ecológicas compatibles con el hábitat de *Coccidioides* spp. y es de donde provienen la mayoría de los casos de CDM del país. Hasta el momento, los pocos estudios realizados en donde se identificaron los aislados sugieren que en Argentina la especie circulante es *C. posadasii*, sin embargo, en otras regiones de América alejadas de California se detectaron casos clínicos autóctonos de CDM donde se aisló *C. immitis*.

El objetivo de este trabajo fue reconocer las especies y feno-genotipos de *Coccidioides* spp. circulantes en la República Argentina.

Se analizaron 47 cepas pertenecientes a 43 pacientes provenientes de diferentes regiones geográficas de Argentina aisladas desde 1967 a 2017 y siete cepas de pacientes mexicanos caracterizadas en origen como *C. immitis*, todas ellas depositadas en la colección de cultivos del Departamento Micología (DMic) de la ANLIS. Se realizó la identificación microbiológica clásica (observación microscópica, producción de exoantígeno y conversión de micelio a esférulas) y molecular, utilizando la secuenciación parcial del gen *Ag2/PRA* y de las regiones ITS1 e ITS2. Las secuencias obtenidas de cada región se alinearon y analizaron utilizando el programa BioEdit y se compararon cada una de ellas con las depositadas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST/n. Se construyeron los árboles para cada grupo de secuencias y también un árbol consenso con las tres regiones analizadas, utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica más acorde para el análisis con el programa MEGA v6.0. Se incluyeron secuencias depositadas en GenBank para enriquecer el análisis.

Las 47 cepas estudiadas presentaron estructuras macro y microscópicas, conversión dimórfica y producción de exoantígeno, compatibles con el género *Coccidioides*.

El análisis de los datos asociados a las cepas aisladas en Argentina nos permitió confirmar que el 47% fueron de pacientes que residen o trabajan en la provincia de Catamarca. Además, no se observó predominio de alguna forma clínica de la enfermedad (52% formas pulmonares y 48% formas diseminadas).

Todas las cepas aisladas de pacientes de Argentina fueron identificadas sin ambigüedad como *C. posadasii*, analizando cada región del genoma individualmente. La variabilidad genética en el caso del gen *Ag2/PRA*, mostró que 46/47 cepas autóctonas fueron idénticas entre sí y diferían de la secuencia de la cepa tipo (AF013256.1, cepa Silveira) en un nucleótido C → G en la posición 1228; la cepa restante fue idéntica a la cepa de referencia.

El análisis de las regiones ITS1 e ITS2 mostró perfiles similares en las cepas de *C. posadasii* autóctonas analizadas en este trabajo y las de otros orígenes geográficos depositadas en GenBank. Las secuencias ITS1 e ITS2 de las cepas de *C. immitis* analizadas en este trabajo, así como las importadas de GenBank, mostraron diferencias intra-especie y la mayor variabilidad se observó en la región ITS2.

Este es el primer trabajo realizado en Sudamérica donde se identifica un número importante de aislados de pacientes con CDM. Este estudio nos permitió concluir, que hasta la fecha, las cepas circulantes en nuestro país son *C. posadasii* y que las mismas tienen baja variabilidad intra-especie en el análisis del gen *Ag2/PRA* y de los fragmentos ITS. Para fortalecer lo antedicho, es necesario vigilar las especies y posibles genotipos de *Coccidioides* spp. obtenidos de pacientes de Argentina como una manera de aportar a la epidemiología de la CDM en las Américas.

Palabras clave: *Coccidioides* spp., identificación fenotípica, *Ag2/PRA*, ITS1, ITS2.

ABSTRACT

Coccidioides is a genus of dimorphic fungi, causative agents of coccidioidomycosis (CDM). Despite its restriction to the arid and semi-arid geographic regions of the American continent, this neglected mycosis has a substantial impact on public health. In the last twenty years an increase in the incidence of the disease has been observed and even new endemic areas have been described.

The genus *Coccidioides* is composed of two species only identifiable by molecular methods: *C. immitis*, restricted to California, USA and neighboring states; and *C. posadasii* in the Americas.

In Argentina, the north and central pre-cordillera regions have the ecological characteristics compatible with the *Coccidioides* spp. habitat and this is where most of the country's CDM cases come from. So far, the few studies conducted where the isolates were identified suggest that in Argentina the circulating species is *C. posadasii*. However, in other regions of America far from California, autochthonous clinical cases of CDM were detected where *C. immitis* was isolated.

The aim of this work was to recognize the species and phenotypes of *Coccidioides* spp. circulating in the Argentina.

We analyzed 47 strains belonging to 43 patients from different geographical regions of Argentina isolated from 1967 to 2017 and seven strains of *C. immitis* from Mexico, all of them deposited in the culture collection of the Mycology Department (DMic) from ANLIS. The classical microbiological identification (microscopic observation, production of exoantigen and mycelial to spherule conversion) as well as molecular methods were used to identify *Coccidioides* strains. Molecular identification was performed through the partial sequencing of the *Ag2/PRA* gene and of the ITS1 and ITS2 regions. The sequences obtained from each region were aligned and analyzed using the BioEdit program and each one was compared with those deposited in the GenBank using the BLAST/n tool. The trees were constructed for each group of sequences and a consensus tree with the three regions analyzed, using the maximum likelihood method and the nucleotide substitution model more appropriate for the analysis with the MEGA program v6.0. Sequences deposited in GenBank were included to enrich the analysis. The 47 strains studied showed macro and microscopic structures, dimorphic conversion and exoantigen production, compatible with the genus *Coccidioides*. The analysis of the data associated with the strains allowed us to confirm that 47% were from patients residing or working in the Argentinean province of Catamarca. In addition,

there was no predominance of any clinical form of the disease (52% pulmonary forms and 48% disseminated forms).

All strains isolated from patients from Argentina were unambiguously identified as *C. posadasii*, analyzing each region of the genome individually. The genetic variability in the case of the *Ag2/PRA* gene, showed that 46/47 autochthonous strains were identical to each other and differed from the sequence of the type strain (AF013256.1, strain Silveira) in a nucleotide G → C at position 1228; the remaining strain was identical to the reference strain.

The analysis of the ITS1 and ITS2 regions showed similar profiles in the autochthonous *C. posadasii* strains and those of other geographical origins deposited in GenBank. The ITS1 and ITS2 sequences of strains of *C. immitis* analyzed in this work, such as those imported from GenBank, showed intra-species differences, and the highest variability was observed in the ITS2 region.

This is the first work done in South America where a significant number of isolates of patients with CDM are identified. This study allowed us to conclude that to date, the circulating strains in our country are *C. posadasii* and that they have low intra-species variability in the analysis of the *Ag2/PRA* gene and the ITS fragments. To strengthen the above, it is necessary to continuously monitor the species and possible genotypes of *Coccidioides* spp. obtained from patients in Argentina as a way to contribute to the epidemiology of CDM in the Americas.

Key words: *Coccidioides* spp., phenotypic identification, *Ag2/PRA*, ITS1, ITS2.

1- INTRODUCCIÓN

Coccidioides immitis y *C. posadasii* son las únicas dos especies reconocidas dentro del género *Coccidioides* [Fisher MC *et al.*, 2002]. Son los agentes causales de la coccidioidomycosis (CDM), una micosis característica del hemisferio oeste, cuyas áreas endémicas se ubican en las regiones áridas y semiáridas de América, con inviernos relativamente templados y suelos alcalinos, no existiendo otra región geográfica de la cuál haya sido posible aislar a estas especies de su hábitat natural: el suelo [Lacy & Swatek, 1974; Saubolle *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2013].

Coccidioides

- Características

Las especies de *Coccidioides* (Reino: *Fungi*, Subreino: *Dikarya*, Phylum: *Ascomycota*, Clase: *Eurotiomycetes*, Orden: *Onygenales*, Familia: *Onygenaceae*, Género: *Coccidioides*, Especies: *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*) son hongos dimorfos; es decir, presentan dos formas biológicas que dependen principalmente de la temperatura y el ambiente donde se desarrollan. La forma micelial la presenta tanto en la fase saprófita-geófito en la naturaleza, como *in vitro* en medio sólido a 25-28 °C y a 35-37 °C. La reproducción asexual se da por la fragmentación de algunas hifas por conidiogénesis talico-ártrica, originando artroconidios enteroártricos. Este proceso se caracteriza por el desarrollo alternado de células por parte de la hifa; por un lado el artroconidio maduro, cuyo tamaño oscila entre 4 y 6 µm de diámetro, por otro, un compartimento vacío, dando el aspecto microscópico de “célula” vacía. La liberación de los artroconidios se completa por separación rexolítica. [Converse, 1956; Kwon-Chung & Bennett, 1992; de Hoog *et al.*, 2000].

La esférula (fase parasítica) es la morfología que adopta el artroconidio al ingresar en los hospederos susceptibles (generalmente mamíferos) ya sea por la vía aérea o por inoculación. Pueden alcanzar un tamaño promedio de 20-80 µm (dependiendo del tiempo de desarrollo y de factores del microambiente) llegando incluso a medir hasta 100 µm. También se puede obtener *in vitro* en medios especiales a 37 °C y concentraciones de CO₂ en el rango del 5-10% [Converse, 1955; 1956; Converse & Besemer 1959; Nguyen *et al.*, 2013].

Hasta el momento no se ha podido observar en ninguna de las dos especies de *Coccidioides* el ciclo sexual en el laboratorio, aunque existe evidencia molecular que lo

sugiere. En otros miembros de los Ascomycetes heterotálicos, con reproducción sexual caracterizada, se han identificado las regiones genómicas que regulan este ciclo: los *loci MAT* (mating type). Si bien la presencia de estos genes es necesaria para la reproducción sexual, no sería suficiente para que ocurra. Para que el apareamiento tenga lugar, los *loci MAT* de cepas compatibles deben tener en una de las cepas la región denominada “caja HMG” (ideomorfo MAT1-2) y en la otra la región “caja α ” (ideomorfo MAT1-1) [Coppin *et al*, 1997; Mandel *et al*, 2007]

- Ecología

En 1932 Stewart & Meyer reportaron el primer aislamiento de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo en el condado de Kern, ubicado en el centro-sur de California, Estados Unidos (EE.UU.), demostrando que este sustrato es la fuente primaria del hongo [Stewart & Meyer, 1932; De Macêdo *et al.*, 2011]. En 1942, un estudio realizado por Emmons fue la base de las posteriores investigaciones sobre la ecología de *Coccidioides*. En su trabajo, informa el hallazgo del hongo en el suelo y en roedores que habitaban la región desértica cercana al pueblo de San Carlos, Condado de Gila, Arizona, EE.UU. Hasta el momento de su trabajo, no se habían detectado casos de infecciones en humanos en esta área [Emmons, 1942; De Macêdo *et al.*, 2011].

Coccidioides spp. crece en suelos con altos niveles de hierro, calcio y magnesio. En presencia de contenido orgánico el hongo aumenta su crecimiento vegetativo. Otro factor que favorece su desarrollo es la salinidad, especialmente las altas concentraciones de borato y cloruro de sodio [Egeberg *et al.*, 1964; Elconin *et al.*, 1964; Cordeiro *et al.*, 2006]. El rango de pH en los suelos analizados de regiones endémicas oscila entre 6,1 y 8,0 parámetros que se ubican desde ligeramente ácidos a francamente alcalinos; aunque en el laboratorio, el rango de tolerancia se amplía desde 3,5 a 9,0 [Lacy & Swatek, 1974; Kolivras *et al.*, 2001].

Las áreas donde se encuentra *Coccidioides* spp., pueden clasificarse en dos grandes grupos: los sitios de crecimiento y los sitios de acumulación. Los sitios de crecimiento son los lugares donde están presentes las condiciones físicas, químicas y biológicas para el desarrollo continuo del ciclo del organismo. Por otro lado, los sitios de acumulación se caracterizan por ser el lugar donde los artroconidios se depositan en el suelo para crecer, luego de ser transportados por aire, agua y otros medios de dispersión. Esta clasificación es dinámica: los sitios de acumulación, bajo condiciones óptimas, pueden transformarse en sitios de crecimiento; pero, bajo circunstancias

adversas, los artroconidios depositados en estos sitios pueden no ser viables por no resistir condiciones extremas de temperatura o privación de nutrientes [Fisher FS. *et al.*, 2007].

El estudio de las características de las regiones endémicas y su reproducibilidad en ensayos de laboratorio, demostró la dependencia de *Coccidioides* spp. a determinados parámetros ambientales y analizando además condiciones extremas, se pudieron catalogar áreas probables de desarrollo y endemidad. Entre estos factores se encuentran la humedad y la temperatura [Egeberg *et al.*, 1964; Lacy & Swatek, 1974; Fisher FS. *et al.*, 2007].

La humedad necesaria para el desarrollo del hongo no sólo depende de la cantidad y el patrón de precipitación anual, sino también de las características físicas del suelo [Comrie, 2005; Fischer FS. *et al.*, 2007]. Las precipitaciones en las regiones endémicas son generalmente estacionales de invierno, que se continúan con veranos secos y calurosos, o bien, inviernos y veranos lluviosos, separados por otoños y primaveras secos con temperaturas cálidas. En cualquiera de los dos casos, las precipitaciones anuales se encuentran en el rango de 300 a 800 mm. Tan importante como las precipitaciones, es la capacidad del suelo para filtrar el agua a profundidades donde *Coccidioides* spp. puede permanecer, generalmente entre 2 a 20 cm de la superficie, o, en el caso de los períodos no lluviosos, desarrollar su forma micelial en zonas más profundas [Fisher FS. *et al.*, 2007].

En cuanto a la temperatura, puede definirse un rango óptimo de desarrollo del hongo entre 20-40 °C, sólo los extremos por encima de 55 °C son letales en corto tiempo, desde horas hasta días. Temperaturas por debajo de 0 °C mantienen los artroconidios en estado latente, siendo viables si se produce el aumento de la misma; aunque exposiciones repetidas a congelamiento/descongelamiento pueden ser letales. En las áreas endémicas de EE.UU. donde se analizaron en conjunto temperatura y profundidad, se observó que durante más de la mitad del año (56 a 66% del tiempo) las temperaturas por debajo de la superficie se mantuvieron dentro del rango óptimo para el desarrollo del hongo, independientemente de la temperatura ambiente [Kolivras *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2006; Fisher FS. *et al.*, 2007].

La tolerancia de *Coccidioides* spp. a ambientes desfavorables, como suelos alcalinos y salinos, altas temperaturas, bajos aportes estacionales de agua, junto con

la imposibilidad de otros microorganismos por competir, explican la exitosa colonización de *Coccidioides* en estas áreas [Baptista-Rosas *et al.*, 2007a].

- Ciclo de vida e infección

El ciclo de vida asexual de *Coccidioides* spp. es único entre los hongos patógenos de importancia médica. En la naturaleza, los micelios septados desarrollan artroconidios, los cuales, a medida que maduran, se individualizan como estructuras con morfología similar a un barril. Factores ambientales como el viento o movimientos naturales de la tierra, así como también la remoción de los suelos por la actividad humana, provocan la dispersión por aire de estas estructuras, que continúan su ciclo de vida saprófito, germinando y dando origen a un nuevo micelio [Galgiani 1993; Nguyen *et al.*, 2013; Lewis *et al.*, 2015].

Estudios en el modelo murino han determinado que sólo unos pocos artroconidios inoculados intranasalmente son suficientes para desarrollar la infección y se ha conjeturado que este es el mecanismo que ocurre en la mayoría de las infecciones en humanos. Ocasionalmente, la exposición puede ser más intensa, como en el caso de los brotes en zonas endémicas, asociados a tareas de construcción [Cummings *et al.*, 2010], excavaciones arqueológicas [Werner & Pappagianis, 1973; Petersen *et al.*, 2004], terremotos y tormentas de viento posteriores a estaciones lluviosas [Comrie, 2005; Brown *et al.*, 2013].

Se ha descrito la infección por *Coccidioides* spp. en roedores, cánidos silvestres, serpientes [Churgin *et al.*, 2013], armadillos, llamas, primates, caballos, reptiles, mamíferos marinos en cautiverio -nutrias y delfines- [Reyes-Montes *et al.*, 2016] y animales domésticos como perros y gatos [Graupmann-Kuzma *et al.*, 2008]. Sin embargo, no se conoce un reservorio animal necesario para completar el ciclo de vida de *Coccidioides* spp. Si bien se ha propuesto que roedores salvajes de las áreas endémicas podrían serlo, esta teoría se basa en la alta tasa de infecciones que se han reportado cerca de sus madrigueras. En ratones infectados experimentalmente, se ha determinado que la ingesta de agua contaminada con *Coccidioides* spp. permite recuperar al hongo a partir del cultivo de sus heces, sin observar infección orgánica [Lubarsky & Plunkett, 1954; Nguyen *et al.*, 2013]. Sin embargo, estudios realizados a lo largo de 5 años, analizando materia fecal de todos los depredadores naturales posibles de estos roedores (coyotes, zorros y lechuzas), no permitieron recuperar el hongo de sus heces. Se sugiere que la alta tasa de infección detectada en lugares

donde habitan los roedores, se debe al ciclo de vida natural de estos animales, quienes al morir, permitirían al hongo reincorporarse al suelo para reiniciar su ciclo de vida saprófito [Nguyen *et al.*, 2013].

Cuando los artroconidios dispersados por aire son inhalados por hospederos susceptibles, comienzan a desarrollar la fase parasítica, que se caracteriza por la formación de las ya mencionadas esférulas. El desarrollo de la esférula comienza entre las 24 y las 36 h posteriores a la inhalación y requiere un tiempo aproximado de 96 a 120 h hasta su estadio maduro. Durante el desarrollo, se produce el engrosamiento de la pared de la esférula, el aumento de su volumen y la formación de septos en sitios múltiples dentro de la misma, continuándose con la compartimentalización del citosol mediante un sistema de membranas y la consecuente producción de endosporas. Hacia el final del ciclo, las endosporas en continuo crecimiento ocupan todo el volumen de la esférula, momento en el que se produce la ruptura de su pared por presión de las endosporas y la inevitable liberación de las mismas. Cada esférula puede originar entre 100 a 300 endosporas y cada una de las endosporas liberadas puede dar lugar a una nueva generación de esférulas [Nguyen *et al.*, 2013; Lewis *et al.*, 2015].

El cambio dimórfico de *Coccidioides* spp., al igual que en otros miembros patógenos del orden Onygenales, está regulado a nivel genético, describiéndose la expresión diferencial de genes en cada una de sus morfologías, e incluso, a lo largo del desarrollo de la esférula [Whiston *et al.*, 2012]. *In vitro*, la conversión artroconidio → esférula requiere una reprogramación transcripcional mayor, con un 22% de todo el genoma expresándose diferencialmente entre las dos condiciones. Además, la expresión génica dentro de las esférulas es dinámica con el 12% del genoma total que se expresa diferencialmente a medida que maduran las esférulas desde el día 2 hasta el día 8 previo a la endosporulación. Por otro lado, muy pocos genes que son importantes para la conversión dimórfica en otros hongos de este grupo, se expresan diferencialmente en la transición dimórfica de *Coccidioides* spp., lo que sugiere que, en el conjunto de hongos dimorfos patógenos, pueden haberse desarrollado diferentes mecanismos para diferenciarse desde la fase del micelio a las formas invasivas en tejidos de hospederos [Viriyakosol *et al.*, 2013].

Historia de la coccidioidomicosis

En 1891 en Argentina, Alejandro Posadas, estudiante de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, tomó contacto por primera vez con el paciente Domingo Escurra, soldado de 36 años, proveniente de la región fronteriza del Gran Chaco de Argentina. El paciente había sido derivado al Hospital Universitario de Buenos Aires con una enfermedad progresiva en la piel, que había comenzado como una pápula en la mejilla derecha y, durante tres años, había avanzado al punto de lesiones ulcerosas y pseudo-verruosas purulentas y supurativas en extremidades, torso y gran parte del rostro acompañado con adenopatía. [Hirschmann, 2007; Welsh *et al.*, 2012].

En 1892, bajo la tutela del prestigioso Dr. Roberto Wernicke en su laboratorio del Departamento de Patología, del Hospital de Clínicas de Buenos Aires, Posadas se abocó al estudio minucioso del progreso de la enfermedad, incluyendo preparaciones microscópicas y anátomo-patológicas. Analizó las neoformaciones producidas y el ciclo de vida de su agente etiológico, al que consideró un esporozoario y denominó Coccídeo describiendo su ciclo y capacidad de invasión [Posadas, 1892].

Denominó a la enfermedad “Coccidiosis” y todos los detalles de su estudio, junto con los tratamientos que recibió el paciente, fueron consignados en su tesis “Psorospermiosis infectante generalizada”, donde concluye que la enfermedad “es capaz de producir tumores cutáneos y ganglionares, cuyo material, al ser inoculado, produce la enfermedad en los animales desarrollándose con rapidez originando infecciones múltiples y generalizadas” [Posadas A. en Belou, 1908].

En la misma época, se reportan en California (EE.UU.) dos casos de pacientes portugueses provenientes de las Azores y trabajadores rurales en el Valle de San Joaquín. El primero, en 1893, Joas Furtado-Silveira y un año después el segundo, Jose Texeira Pereira. Ambos pacientes presentaban lesiones cutáneas, principalmente en cara y cuello, que progresaron a otros sitios, acompañadas con decaimiento general, fiebre y desenlace fatal. En los preparados microscópicos se observaron abundantes organismos similares a protozoarios. En el cultivo de los especímenes, solo creció un moho blanquecino, que fue descartado como contaminante. Varias muestras para estudios patológicos fueron enviadas al Dr. Rixford -Cooper Medical College, actualmente Facultad de Medicina de la Universidad de Standford en California- y al Dr. Gilrich -Facultad de Medicina John Hopkins, Baltimore, Maryland. Ambos determinaron la existencia de microorganismos similares a los descritos por

los doctores Posadas y Wernicke en Argentina [Hirschmann, 2007; Welsh *et al.*, 2012]. Rixford y Gilrich concluyeron que el microorganismo era un protozooario, la vía de ingreso era la piel y que no era contagioso. Por su morfología “similar a coccidios”, denominaron *Coccidioides immitis* (al aislado de Silveira) y *Coccidioides pyogens* (al aislado de Texeira) [Welsh *et al.*, 2012]. A estos dos pacientes, se sumaron otros cuyo lugar de trabajo era el mismo y en todos los casos el desenlace fue fatal.

William Ophüls -profesor de patología y bacteriología del Cooper Medical College- y Hebert Moffitt cultivaron material de uno de los pacientes, obteniendo el mismo moho. Inocularon en cobayos de manera intraperitoneal, tejido y material purulento proveniente de lesiones de pacientes y paralelamente el micelio obtenido de los cultivos fue inyectado en conejos. Los conejos desarrollaron los nódulos característicos de la infección observada en humanos y microscópicamente observaron las mismas estructuras. Preliminarmente, informaron que el agente causal de la enfermedad era un hongo y no un protozooario [Ophüls & Moffitt, 1900; Hirschmann, 2007].

En 1905, Ophüls publicó un trabajo detallando las diferentes morfologías que adoptaba el hongo, así como las condiciones para que éstas ocurrieran [Ophüls, 1905a]. Denominó a la patología “Granuloma coccidioidal”, considerándola una micosis progresiva y fatal. Además, describió la presencia de la infección en pulmones de pacientes sin desarrollo de manifestaciones cutáneas, sugiriendo que la vía principal de ingreso al organismo era por inhalación [Ophüls, 1905b; Hirschmann, 2007; Negroni, 2008].

Estudios relacionados con la inmunología de la enfermedad, realizados en EE.UU. por Cooke [1915] y posteriormente por Hirsh y Benson [1927] fueron fundamentales para el desarrollo de la “coccidioidina”, producto del filtrado de cultivo de *Coccidioides*. Se convierte así en el primer reactivo utilizado para pruebas dérmicas, siendo positivo en aquellas personas que tuvieron la enfermedad y cuyo uso se ampliaría en estudios epidemiológicos [Hirschmann, 2007].

En 1929, se cuestiona la idea general de que la infección por *Coccidioides* era fatal, luego que un estudiante de medicina inhalara accidentalmente esporas a partir de un cultivo de *Coccidioides* mientras trabajaba en el laboratorio del Dr. Dickson en la Universidad de Medicina de Standford. El paciente desarrolló neumonía, en muestras

respiratorias se observaron esférulas, recuperaron el hongo en cultivo y lograron infectar animales. A pesar estos hallazgos, sobrevivió [Brown *et al.*, 2013].

Dickson asocia la ya conocida “Fiebre de San Joaquín” -una enfermedad autolimitada caracterizada por tos, dolor de pecho, fiebre y eritema nudoso- con la infección por *Coccidioides*. En su reporte de 1937, concluyó que el hongo *Coccidioides* era la causa de la “Fiebre de San Joaquín” [Dickson, 1937]. Junto con los estudios realizados por Gifford, amplían el espectro clínico de la enfermedad. Concluyen que la infección por *Coccidioides* es común en la región del Valle de San Joaquín en California, usualmente es moderada, se diagnostica como gripe o neumonía y su recuperación no deja secuelas aparentes. Sólo se diagnosticaba como “Fiebre de San Joaquín” con la aparición de eritema nudoso y el “Granuloma coccidioidal” era su forma fatal. Proponen el nombre de Coccidioidomicosis para incluir a todos los tipos de infección causadas por el hongo *Coccidioides*. [Dickson & Gifford, 1938].

A partir de la década del 40', Smith realizó durante dos años estudios de la población con historia de Fiebre de San Joaquín en los condados de Kern y Tulare en California, EE.UU. Mediante pruebas dérmicas, analizó los patrones de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas, incluyendo distribución por período estacional, sexo y edad. Concluyó que en la mayoría de los casos las infecciones fueron leves y no hubo evidencia de transmisión persona a persona [Smith C, 1940; Brown *et al.*, 2013] y describe las variedades de infección causadas por *Coccidioides* spp. [Smith C *et al.*, 1946]. Los aportes de Smith y sus estudios epidemiológicos permitieron delimitar el área endémica de la enfermedad en EE.UU. a la región de California.

Cuadro clínico y manifestaciones de la Coccidioidomicosis

La dispersión aérea e inhalación de los artroconidios, constituyen la vía clásica de infección al organismo, siendo el pulmón el órgano blanco del hongo. Sin embargo, una vez instalada a nivel pulmonar, la infección puede diseminarse por vía hematogena y/o linfática a cualquier órgano, proceso que depende del estado inmunológico de los hospederos susceptibles así como también de la carga fúngica [Parish & Blair, 2008; Nguyen *et al.*, 2013]. Si bien no está determinada la carga fúngica exacta, es probable que la infección en humanos se pueda establecer con cantidades muy bajas (posiblemente entre 1-10 artroconidios) [Galgiani, 1993; Stevens *et al.*, 2009].

- Clasificación y Cuadro Clínico

Varios estudios epidemiológicos determinaron que alrededor del 60% de los individuos afectados con *Coccidioides* spp. son asintomáticos, siendo sólo detectables por la reactividad a la prueba cutánea, mientras que el restante 40% desarrollan algún tipo de síntoma. Estos porcentajes se ven modificados en los casos de brotes, ya que la exposición al patógeno es más alta que la media, considerándose que la presencia de síntomas es dependiente de la carga fúngica, llegando en algunos casos, al 90% de infectados sintomáticos [Cox & Magee, 2004; Arenas, 2008; Cummings *et al.*, 2010; Welsh *et al.*, 2012].

En la mayoría de los pacientes con sintomatología, la primera manifestación clínica es la neumonía aguda, con un período de incubación que oscila entre 1 a 3 semanas. Los síntomas más comunes incluyen tos, fiebre, dolor de pecho, dolor de cabeza, fatiga, malestar general y anorexia. Las radiografías de tórax muestran típicamente infiltrados pulmonares, que pueden ser simples o múltiples y son más frecuentemente hiliares o basales en ubicación. Puede presentarse adenopatía hilar y derrame pleural. La neumonía aguda asociada a CDM puede presentar, aunque con baja frecuencia, manifestaciones cutáneas como eritema nudoso, eritema tóxico y eritema multiforme, que reflejan una respuesta inmune exacerbada más que una diseminación de la enfermedad; adicionalmente, la presencia de eritema nudoso está asociado a pronóstico favorable [Cox & Magee, 2004; DiCaudo, 2006; Parish & Blair, 2008; Stockman & Thompson, 2016].

Una presentación poco común y más severa que la neumonía aguda, es la neumonía difusa, que se asocia a la infección por exposición a altas dosis del hongo y su diseminación por vía hematógena. Esta presentación también se observa de manera frecuente en pacientes con diversos tipos de inmunosupresión (infección por HIV, oncohematológicos o por tratamientos con terapias inmunosupresoras) [Galgiani *et al.*, 2005; Parish & Blair, 2008; Stockman & Thompson, 2016].

Aunque la mayoría de los casos de neumonía aguda resuelven espontáneamente, un porcentaje de estas neumonías se vuelven persistentes por al menos 3 meses, en una condición denominada neumonía crónica progresiva, que se caracteriza por tos persistente, producción continua de esputo, hemoptisis y pérdida de peso. El hallazgo radiográfico más común es la presencia de nódulos uni o multi

focales, con cavitación. La serología de estos pacientes es generalmente positiva [Parish & Blair, 2008].

En menos del 5% de los pacientes inmunocompetentes la CDM puede evolucionar a una infección diseminada extrapulmonar. Es más frecuente encontrar estas formas en niños menores de un año, mujeres embarazadas, inmunocomprometidos y diabéticos. La CDM extrapulmonar puede afectar cualquier área del cuerpo, siendo los sitios de diseminación más frecuentes: piel, huesos, nódulos linfáticos, hígado, bazo, riñón y articulaciones. Generalmente es diagnosticada muchos meses después de la aparición de los síntomas pulmonares [Parish & Blair, 2008; Twarog & Thompson, 2015].

De las manifestaciones de CDM extrapulmonar, la más severa es la meningitis coccidioidal que, con pocas excepciones, se presenta en los primeros meses luego de la infección primaria y puede ocurrir hasta en un 50% de los pacientes con CDM diseminada. Los síntomas comunes incluyen dolor de cabeza, estado mental alterado, náuseas, vómitos y podría presentarse fiebre. La hidrocefalia y el infarto cerebral pueden presentarse inicialmente o como una complicación tardía. [Johnson & Einstein, 2006]. En ambos casos, su presencia está asociada a las formas más graves e incluso mortales de la enfermedad [Parish & Blair, 2008]. La serología del líquido cefalorraquídeo (LCR) es positiva, con alto recuento de glóbulos blancos, proteinorraquia y bajos niveles de glucosa. Los estudios de imagen son útiles para evaluar las complicaciones asociadas con la meningitis, debido a que las características iniciales de la enfermedad pueden ser difíciles de distinguir de otras, especialmente tuberculosis e incluso enfermedades autoinmunes [Stockman & Thompson, 2016].

La CDM puede ser adquirida excepcionalmente por vía percutánea. La mayoría de estas infecciones se han documentado en trabajadores rurales, personal de laboratorio y personas que han sufrido laceraciones con astillas. La CDM cutánea primaria se manifiesta como un nódulo ulcerado, supurativo y doloroso en el sitio del inóculo. Con un patrón similar a la esporotricosis, a veces aparecen nódulos secundarios en distribución lineal a lo largo de las vías linfáticas. Pueden presentarse linfadenopatía y fiebre regional. En la mayoría de los casos, las infecciones primarias de la piel resuelven espontáneamente [DiCaudo, 2006].

Epidemiología

Como se comentó anteriormente, la CDM es una enfermedad exclusiva del hemisferio Oeste, endémica en América y se han determinado regiones específicas, caracterizadas por el clima y el tipo de suelo, particularmente comprendidas entre los paralelos 40°N y 40°S [Hector & Laniado-Laborin, 2005]. La mayoría de los casos reportados fuera de las áreas endémicas conocidas se presentaron en personas que estuvieron o visitaron dichas áreas y desarrollaron sintomatología leve o formas latentes que reactivaron la infección meses después [Brown *et al.*, 2013; Twarog & Thompson, 2015].

Las áreas endémicas con mayor prevalencia de la enfermedad incluyen el suroeste de los EE.UU.-en los estados de Arizona, California, Nuevo México, Nevada y Texas-, norte de México -de costa a costa en paralelo al límite con EE.UU.- y la zona del litoral del Pacífico, nordeste de Brasil y parte de la región precordillerana de Argentina. Ciertas regiones de Venezuela, Colombia, Guatemala, Honduras, Bolivia y Paraguay han reportado casos autóctonos [Negróni, 2008; Canteros *et al.*, 2010; Stockman & Thompson, 2016].

En California en el período 2001-2010, la incidencia de la enfermedad se incrementó de 4,3 a 11,6 casos cada 100.000 habitantes, particularmente, en el condado de Kern -una de las mayores áreas endémicas descritas- solo en 2011 se reportaron 241 casos cada 100.000 habitantes [Stockman & Thompson, 2016]. En el año 2013, un reporte de Tsang *et al.* publicado por el CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades -CDC por sus siglas en inglés-), tomando los datos de las diferentes regiones durante el período 1998-2011, determinó que la incidencia de la CDM en las áreas endémicas presenta un patrón de aumento sustancial y significativo año tras año, con una leve disminución en el período 2007-2008, luego del cual, la incidencia tomó los valores porcentuales de aumento más altos registrados a lo largo de todo el periodo analizado [Tsang *et al.*, 2013]. Debido a que la CDM no es una enfermedad de reporte obligatorio en algunos estados -incluso donde es endémica- este informe aporta datos que probablemente estén por debajo de la casuística real. Adicionalmente, hay reportes de casos autóctonos en el sudeste del estado de Washington, donde se ha aislado *Coccidioides immitis* del suelo, determinándose una “nueva área endémica” [Litvintseva *et al.*, 2015].

En México, durante el periodo 1988-1994 se determinó una tasa de incidencia nacional de 0,5 a 1,3 con una media de 0,8 casos cada 100.000 habitantes. Los porcentajes más elevados se localizaron en los estados de Nuevo León (2,6), Tamaulipas (2,1), Chihuahua (1,8), Baja California (1,6) y Sonora (0,7) [Baptista-Rosas & Riquelme, 2007b]. En un reporte del año 2017, el análisis de nuevos casos en el período 2004-2015, confirma las áreas endémicas descritas anteriormente, identificándose, en este periodo, al estado de Sonora como el de mayor incidencia en el país [Manzanares, 2017].

En Centroamérica, en 1951 se reportó el primer caso en Honduras [Castro & Trejos, 1953]. Estos mismos autores encabezan un estudio epidemiológico en el valle de Comayagua -lugar en el que había vivido el paciente del caso los últimos 24 años- donde observan un índice de positividad en las pruebas dérmicas del 15,7% [Negróni, 2008], refiriendo, de esta manera la existencia de una nueva área endémica en el mencionado valle [Castro & Trejos, 1953]. Guatemala y El Salvador han reportado casos autóctonos en 1960 y 1959 respectivamente, aunque no hay publicaciones recientes de estudios epidemiológicos en estos países [Negróni, 2008].

En Venezuela, la CDM ha sido reportada desde 1948 cuando el Dr. Campins reportó el primer caso en Barquisimeto, estado de Lara. Posteriormente, más pacientes fueron reportados y la mayoría provenían de los estados de Lara, Falcón y Zulia. Hasta 2014, el número de casos confirmados de CDM publicados en estudios epidemiológicos, reportados por Grupos de Trabajo en Micología o colectados por laboratorios es de 114, circunscribiendo las áreas endémicas a las zonas áridas y semiáridas de los estados anteriormente mencionados [Martínez-Méndez *et al*, 2013; Martínez-Méndez *et al*, 2015].

En Brasil, el primer caso se reportó en 1978 en un paciente del estado de Bahía. En 1994 se da a conocer una micro-epidemia entre cazadores de armadillos en el estado de Piauí. Otros casos se han informado en los estados de Ceará y Maranhao. La incidencia de la enfermedad se ha incrementado en los últimos años, registrándose 90 casos en el periodo 1999-2005 [Wanke *et al*, 1999; Negróni, 2008]. El último reporte publicado al respecto registra, al año 2011, 829 casos nuevos [Giacomazzi *et al.*, 2016].

En Argentina, el hábitat natural favorable para *Coccidioides* se encuentra en las zonas áridas de la precordillera, desde la provincia de Jujuy hasta Rio Negro. El primer

estudio epidemiológico realizado en nuestro país es del año 1947 y consistió en la realización de pruebas cutáneas con coccidioidina en niños habitantes del norte de la Patagonia, después de la aparición de un caso clínico en dicha área. Sobre 1834 niños de entre 6 y 15 años, se detectaron patrones de positividad entre el 7 y 10% [Negroni P *et al.*, 1949; Negroni R, 2008]. Estudios posteriores de los mismos autores realizados durante los años 50's - 60's también con pruebas cutáneas, revelaron zonas endémicas, dentro de las cuales, los índices más altos de infección se encontraban en las provincias de Catamarca, Córdoba, Santiago del Estero, La Rioja y San Luis, si bien los informes de la enfermedad propiamente dicha eran escasos [Negroni R, 2008; Canteros *et al.*, 2010].

En 1967, una publicación del Dr. Pablo Negroni informaba en Argentina 27 casos de CDM hasta 1964, incluido el paciente del Dr. Posadas. Al igual que en otros países, la información es sub-estimada ya que no es una patología de comunicación obligatoria. En una revisión de casos clínicos humanos, realizada en 2010 por los laboratorios que forman la Red Nacional de Laboratorios de Micología, se informa de la existencia de 101 casos más, elevando la cifra a 128 casos en el periodo 1892-2009, siendo la provincia de Catamarca la principal área endémica del país. Es en esta provincia, donde entre 2006 y 2009, la tasa de incidencia se incrementó de valores históricos de 0,5 a 2,0 casos cada 100.000 habitantes [Canteros *et al.*, 2010].

Todos los reportes epidemiológicos coinciden en manifestar que la incidencia de la enfermedad está en aumento y que el número de casos está subestimado ya que la CDM no es de reporte obligatorio nacional en ninguno de los países con regiones endémicas confirmadas. Entre los factores que pueden influir en el aumento de casos de CDM se sugieren: el aumento de la población en general y de los pacientes inmunosuprimidos en particular; cambios ambientales, remoción de suelos producidos por la construcción así como por el aumento de áreas cultivables y la inclusión de nuevas pruebas diagnósticas para detectar la enfermedad [Tsang *et al.*, 2013]. Asimismo, el reconocimiento y estudio de las zonas endémicas ha sido fundamental para la sospecha y/o confirmación del diagnóstico.

Diagnóstico de la coccidioidomicosis

Los métodos de laboratorio para el diagnóstico de las infecciones por hongos abarcan distintas metodologías: la detección microscópica del agente etiológico en el material clínico, el aislamiento e identificación del hongo en cultivos y la detección de

una respuesta serológica al patógeno. En los últimos años se han desarrollado nuevos procedimientos diagnósticos basados en la detección de ADN fúngico en el material clínico. Sin embargo, estas técnicas no tienen un impacto significativo en la mayoría de los laboratorios clínicos [Duarte-Escalante *et al.*, 2014].

Particularmente, el cuadro clínico de la CDM es bastante inespecífico. La sintomatología similar a la de un estado gripal o “neumonía de la comunidad” dificulta su detección. Estos síntomas en áreas endémicas o en pacientes que hayan viajado a ellas, son sugerentes para sospechar la enfermedad. El aislamiento de *Coccidioides* spp. en cultivo a partir de materiales biológicos sigue siendo el más efectivo de los métodos diagnósticos [Twarog & Thompson, 2015].

- Examen directo

Este examen se realiza directamente sobre la muestra remitida -si fuera posible- y el agregado de hidróxido de potasio (KOH) 10-20%. Al microscopio pueden observarse las características esférulas de diferente tamaño, con paredes gruesas en cuyo interior pueden o no observarse las endosporas. El tamaño de la esférula, así como la observación de las endosporas es dependiente del tiempo de desarrollo. Si bien la presencia de esférulas conteniendo endosporas es diagnóstico de CDM, no siempre se encuentran en el material [Saubolle *et al.*, 2007].

Con baja frecuencia, en muchos materiales, la forma micelial puede ser la morfología dominante, dificultando su identificación. Pueden observarse hifas septadas de variable longitud, ramificadas o no, cadenas cortas de células ovales, más parecidas a levaduras en gemación que a esférulas en formación. Adicionalmente, pueden observarse endosporas libres o agrupadas en forma de mórula [Muñoz *et al.*, 2004]. Asimismo, se han observado estas morfologías en SNC de pacientes con CDM, tanto en tejido cerebral como en fluido cerebro-espinal [Hagman *et al.*, 2000]. Estos polimorfismos asociados a la fase parasítica e independientes del lugar de aislamiento, dificultan el diagnóstico preciso a la hora de su visualización, pudiéndose confundir con otras infecciones fúngicas ocasionadas por hifomicetes de micelio tabicado y levaduras [Nguyen *et al.*, 2013; Muñoz-Hernandez *et al.*, 2014].

- Histología

La tinción de Grocott-metenamina de plata es la coloración más sensible para detectar hongos en preparaciones histológicas [Saubolle *et al.*, 2007]. Otras

coloraciones utilizadas, aunque menos sensibles para este tipo de preparaciones incluyen H-E (hematoxilina-eosina) y PAS (ácido peryódico de Schiff). Ocasionalmente pueden utilizarse en preparados, las coloraciones de Papanicolau, Giemsa y Mucicarmin. La coloración de Gram no se utiliza como rutina diagnóstica [Saubolle *et al.*, 2007; Muñoz-Hernandez *et al.*, 2014].

- Cultivo

El “gold standard” para el diagnóstico de la CDM es el cultivo, ya que posibilita la identificación de *Coccidioides* spp. El hongo crece bien en la mayoría de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio de micología, siendo los más indicados los medios adicionados con cicloheximida y cloranfenicol, ya que la presencia de contaminantes o “flora mixta”, puede inhibir su crecimiento debido a su baja capacidad de competición [Saubolle *et al.*, 2007].

El tiempo requerido para la observación de crecimiento es al menos de 5 a 10 días, no debiendo descartarse el material antes de los 30 días. No es recomendable la realización de cultivo en lámina ni colonia gigante en placa debido al alto riesgo de infección por aerosolización de artroconidios infectantes. Morfológicamente, la mayoría de las cepas en cultivo muestran aspecto algodonoso con desarrollo aéreo blanco, bordes continuos y reverso claro. Sin embargo, pueden encontrarse cepas con diferentes texturas (granulosas, arrugadas o aterciopeladas), colores (gris, amarillo o canela) y la presencia de pigmentos difusibles que le otorgan al reverso del cultivo coloración naranja o marrón [Kwon-Chung & Bennett, 1992]. Si en el disgregado del cultivo con lactofenol azul de algodón se observan artroconidios, es necesario hacer la conversión “*in vitro*” a esférulas. Este procedimiento requiere la realización de suspensiones seriadas de artroconidios y posterior cultivo en medio líquido de “Converse” a 37 °C con 5-10% de CO₂, durante un tiempo mínimo de 7 días y máximo de 4 semanas [Converse, 1956; Converse & Besemer, 1959]. La observación de esférulas por esta metodología es otro criterio de identificación, pero su ausencia no lo descarta. Para la identificación a nivel género de los cultivos, se deben cumplir dos de tres criterios de identificación: macro y micromorfología, conversión dimórfica y producción de exoantígeno específico [Kwon-Chung & Bennett, 1992].

La manipulación de cultivos en fase micelial debe realizarse bajo estrictas normas de bioseguridad, restringiendo su procesamiento a laboratorios con presión

negativa, Cabinas de Seguridad Biológica de tipo II y prácticas de nivel de bioseguridad 3 (BSL3) [Twarog & Thompson, 2015].

- Pruebas inmunológicas: detección de antígenos y anticuerpos

Las pruebas serológicas más utilizadas y específicas para el diagnóstico de CDM a partir de suero o LCR son la inmunodifusión (ID) y la fijación del complemento (FC). La primoinfección pulmonar induce la síntesis de inmunoglobulinas que no tienen efecto protector contra el hongo, pero son indicadores valiosos para confirmar el diagnóstico y valorar el pronóstico. Estas pruebas se basan en la identificación de anticuerpos IgM (respuesta temprana) o IgG (respuesta tardía) frente a antígenos coccidioidales mediante inmunodifusión [Carrada-Bravo, 2014]. En la infección aguda, casi la mitad de los pacientes muestran IgM detectable en la primera semana y aproximadamente 90% en la tercera semana. Aunque la IgM disminuye con el tiempo, la IgG se detecta entre los meses 1 a 3 de la infección aguda y puede persistir durante 6 a 8 meses más. Los resultados cuantitativos de la prueba de FC son útiles para evaluar la gravedad de la enfermedad y, correlacionándolos con los síntomas del paciente, poder determinar una respuesta terapéutica [Twarog & Thompson, 2015]. Los títulos de FC son proporcionales a la gravedad de la infección, considerándose que con valores superiores a 1/16 hay mayor posibilidad de enfermedad diseminada [Stockman & Thompson, 2016]. Por otra parte, estos métodos tienen ciertas limitaciones tales como la capacidad del paciente para producir anticuerpos (personas inmunosuprimidas) o en los estadios tempranos de la enfermedad [Nguyen *et al.*, 2013].

La intradermorreacción (IDR), prueba cutánea, o reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) es positiva en aproximadamente el 80% de los pacientes que desarrollan la forma pulmonar y sólo en menos del 30% de los que desarrollan las formas progresivas o crónicas, por lo que un resultado negativo no debe ser tomado como ausencia de enfermedad [Cox & Magee, 2004]. Un resultado positivo, agiliza el diagnóstico con respecto a las pruebas serológicas y tiene además valor epidemiológico ya que indica contacto previo del individuo con el hongo -como en el caso de turistas o viajeros a zonas endémicas- y no necesariamente enfermedad, por lo que el resultado debe ser evaluado en el contexto del cuadro clínico. En pacientes con CDM confirmada, esta prueba tiene valor predictivo: los resultados negativos son indicadores de posibles recaídas, mientras que los positivos disminuyen drásticamente

esta posibilidad y, por lo tanto, son de buen pronóstico, sobre todo si se sostienen en el tiempo [Wack *et al.*, 2015].

- Diagnóstico molecular

Las técnicas moleculares para el diagnóstico en muestras clínicas no requieren el cultivo previo del hongo y son independientes de la respuesta del hospedero, lo que las convierten en una herramienta fundamental al momento de la evaluación de los pacientes con algún tipo de compromiso en la inmunidad o en aquellos que no desarrollan respuesta frente a la infección. El material de partida para el diagnóstico molecular puede ser suero, LCR, líquido pleural, esputo, biopsias frescas e incluso tejidos fijados y parafinados [Johnson *et al.*, 2004; Bialek *et al.*, 2004; Binniker *et al.*, 2007; De Aguiar *et al.*, 2007; Canteros *et al.*, 2015].

De las técnicas moleculares, las más difundidas y utilizadas son los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen todas las técnicas basadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) [Duarte-Escalante *et al.*, 2014].

El uso y tipo de PCR para el diagnóstico de CDM está determinado por la secuencia blanco y, en algunos casos, por el material a analizar. Los marcadores más utilizados en el diagnóstico e identificación molecular de *Coccidioides* spp. son: un fragmento del gen que codifica para el antígeno rico en prolina (*Ag2/PRA*) y la región ITS del ADNr. Para la detección de la región correspondiente al gen *Ag2/PRA* se utilizan PCR-anidada y PCR en tiempo real [Bialek *et al.*, 2004; De Aguiar *et al.*, 2007], mientras que para la detección de ITS se utilizan la PCR clásica asociada a secuenciación y la PCR en tiempo real [Johnson *et al.*, 2004; Binniker *et al.*, 2007; Vucicevic *et al.*, 2010; Gago *et al.*, 2014]. Estas metodologías también han sido probadas y validadas en cultivos obtenidos a partir de muestras clínicas y comparadas con especies relacionadas del orden *Onygenales*, con alto grado de sensibilidad y especificidad a nivel de género.

Identificación de especies y caracterización genética

Hasta hace poco tiempo, *Coccidioides immitis* era considerada una sola especie. Uno de los primeros trabajos en los que se menciona la existencia de dos grupos genéticamente diferenciables dentro de la especie, data de 1994 y utiliza la técnica de RFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción). Analizando el ADN total de 15 aislados de diferente origen clínico y geográfico

observaron un grupo (Grupo I) formado por dos cepas de CA (una de ellas, la cepa tipo para el Género: cepa Silveira) y otro (Grupo II) que comprendía nueve aislados de pacientes residentes en varios condados del Valle de San Joaquín (CA) con diversos cuadros clínicos; un aislado de un paciente residente en el estado de Lara, Venezuela, dos aislados de suelo de regiones arqueológicas de CA -donde se habían producido infecciones- y un aislado de león marino también de CA. Estos grupos, diferenciados por su perfil electroforético, no pudieron ser asociados con la virulencia ni con el origen del aislamiento [Zimmermann *et al.*, 1994].

En 1997 Koufopanou y cols. utilizaron genealogías de 5 genes nucleares (quitina sintasa, serina proteinasa, orotidina descarboxilasa, quitinasa y dioxigenasa) y asociaron las diferencias encontradas entre los dos grupos descritos por Zimmermann a dos poblaciones geográficamente separadas: una, característica de la región de California (*C. immitis* California -coincidente con el Grupo II de Zimmermann-) y la otra, los aislamientos fuera de esta región (*C. immitis* non-California -coincidente con el Grupo I de Zimmermann). En este mismo trabajo, se analizaron 6 cepas de pacientes argentinos, 5 de las cuales correspondían a la población non-California y una a la población California [Koufopanou *et al.*, 1997]. Otros autores como Burt y cols. analizaron los polimorfismos presentes en diversas regiones del genoma [Burt *et al.*, 1997] y Fisher y cols. utilizaron secuencias de microsatélites [Fisher *et al.*, 1999] para confirmar la existencia de las dos poblaciones de *Coccidioides immitis*.

En 1999, el análisis molecular de la secuencia de ADN que codifica para un fragmento del *Ag2/PRA* y su comparación entre aislados clínicos de pacientes de diversos orígenes geográficos reveló una delección de 12 nucleótidos en las cepas correspondientes a *C. immitis* California (antes Grupo II). Además mostró cambios de bases entre las poblaciones, la mayoría de las cuales se encuentran en regiones no codificantes del gen [Peng *et al.*, 1999].

En 2002, Fisher y cols. realizaron análisis filogenéticos sobre 167 aislados representativos de todas las regiones geográficas donde *Coccidioides* spp. había sido aislado, entre las que figuraban Argentina, Brasil, Venezuela, México y EE.UU. Analizando las distancias genéticas de 9 microsatélites determinaron que la población de *C. immitis* non-California representaba un clado monofilético, genéticamente divergente de *C. immitis*, dándole la categoría de especie y renombrándola como *Coccidioides posadasii*, en honor a Alejandro Posadas, quien describió la enfermedad

por primera vez. En este mismo trabajo, determinaron que ambas especies pueden ser diferenciadas por la presencia de numerosos polimorfismos [Fisher MC. *et al.*, 2002].

Ya reconocidas las dos especies y en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares para identificarlas, se analizó el uso de la secuenciación de las regiones ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2) para éste género con los *primers* diseñados por White y cols. [White *et al.*, 1990] para identificación molecular de otros hongos a nivel de especie. Para ello, Tintelnot y cols. utilizaron diferentes combinaciones de los *primers* para las regiones ITS y adecuaron los protocolos para identificar especies de *Coccidioides* spp. Estos autores observaron inconvenientes en la amplificación completa del fragmento ITS1-2 usando los *primers* ITS5 (o ITS1):ITS4; no así en la amplificación del ITS-2 usando los *primers* ITS3:ITS4, que les permitió la identificación sin ambigüedad de las especies [Tintelnot *et al.*, 2007].

En un estudio más reciente, Johnson y cols., re-analizaron 13/15 aislados previamente examinados por Zimmermann en 1994, secuenciando la región ITS-ADNr. Al igual que Tintelnot y cols, cuando la amplificación del fragmento ITS completo no fue posible, utilizaron los *primers* para las regiones ITS1 (ITS1:ITS2) e ITS2 (ITS3:ITS4) confirmando que el Grupo I corresponde a *C. posadasii* y el Grupo II a *C. immitis* [Zimmermann *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2015].

Otros autores han utilizado marcadores alternativos de identificación, como la amplificación y secuenciación de la región “U”. Este método resultó ser sencillo ya que utilizaba una amplificación de un paso que permitía identificar especies [Umeyama *et al.*, 2006]; sin embargo, el resultado mostró inconsistencias ya que una cepa identificada como *C. posadasii* posteriormente fue identificada como *C. immitis* utilizando la secuenciación de ITS1-2 [Tintelnot *et al.*, 2007] y cinco cepas identificadas como *C. posadasii* posteriormente fueron identificadas como *C. immitis* utilizando la secuenciación de *Ag2/PRA* y microsatélites [Luna-Isaac *et al.*, 2014].

Los métodos moleculares aportan las herramientas para analizar las cepas circulantes en las regiones endémicas y así poder asociar su presencia a determinada región geográfica. En este sentido, los estudios más recientes en los diferentes países con áreas endémicas confirmadas, se enfocan en la identificación y variabilidad genética inter e intra-especie y las relaciones entre el patógeno, el ambiente y el hospedero [Brilhante *et al.*, 2013; Luna-Isaac *et al.*, 2014]. El análisis de genoma completo no solo ha determinado la diferenciación entre las dos especies sino que ha

identificado la presencia de poblaciones dentro de cada una de ellas y el origen ancestral de las mismas [Engelthaler *et al.*, 2016].

2- HIPÓTESIS

Los métodos moleculares permiten identificar dos especies de *Coccidioides*: *C. immitis*, principalmente endémico en California (aislado con menos frecuencia en otros estados de EE.UU. y norte de México) y *C. posadasii*, endémico en el resto de América. Hasta el momento, pocas cepas aisladas de pacientes en Argentina fueron analizadas a nivel genético, con lo que el conocimiento de las especies y los fenotipos circulantes en el país es insuficiente. ¿Con los actuales conocimientos y herramientas, se puede afirmar fehacientemente que en Argentina *C. posadasii* es la especie mayormente circulante?

OBJETIVO GENERAL

Reconocer las especies y feno-genotipos de *Coccidioides* spp. circulantes en Argentina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Re-identificar fenotípicamente las cepas de *Coccidioides* spp. depositadas en la colección de cultivos del Departamento Micología del INEI-ANLIS.
- 2- Secuenciar la región del gen *Ag2/PRA* para identificar las cepas de *Coccidioides* spp.
- 3- Secuenciar las regiones ITS1 e ITS2 para identificar y caracterizar las cepas de *Coccidioides* spp.
- 4- Comparar las secuencias obtenidas de manera individual y en conjunto para reconocer especies circulantes, detectar genotipos regionales y conocer las relaciones genéticas con cepas de otros orígenes geográficos.

3- MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se estudiaron en total, 54 cepas de *Coccidioides* spp. depositadas en la Colección de Cultivos del Departamento Micología (DMic) del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, 47 correspondientes a aislamientos autóctonos, incluido un caso veterinario. Hasta 2007, 13 cepas fueron depositadas como *C. immitis* y a partir de ese año, con el uso de metodologías de biología molecular, 34 cepas se identificaron como *Coccidioides* spp. o *C. posadasii*. Todas las cepas procedían de diferentes materiales clínicos de 43 pacientes de distintas regiones geográficas de Argentina y constituyen el total de cepas viables aisladas en nuestro país desde 1967 hasta 2017 en nuestro laboratorio. Además se incluyeron 7 cepas de *C. immitis* provenientes de pacientes de México que fueron gentilmente cedidas por las Dras. María del Rocío Reyes Montes y Esperanza Duarte-Escalante, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales fueron depositadas en la Colección de Cultivos DMic.

Las cepas estaban conservadas en fase micelial (M) en aceite mineral a 4 °C en la Unidad Operativa Centro de Contención Biológica (UOCCB) de la ANLIS. Para este estudio las cepas fueron subcultivadas en Agar Sabouraud adicionado con cicloheximida y cloranfenicol (AS-CC -ver anexo-) a 28 °C.

Todos los procedimientos que implicaron la manipulación de cultivos fueron realizados en estrictas condiciones de seguridad, en Cabina de Seguridad Biológica Tipo II Clase A2 en el laboratorio de contención biológica (BSL3) de la UOCCB. Asimismo, todo el material retirado de la UOCCB contó con los controles de inactivación biológica requeridos para su manipulación segura fuera de dichas instalaciones, según las recomendaciones del Manual Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina [CDC, 2009].

Los medios de cultivo que se utilizaron para el desarrollo de *Coccidioides* spp. en los diferentes experimentos y su composición se detallan en el Anexo.

Las características de las cepas y su origen, obtenidas de las fichas de derivación de muestras, fueron incluidas en una tabla “ad hoc” para su posterior análisis.

Identificación fenotípica

- Características macroscópicas de la fase M:

En tubos de 150 x 10 mm con medio AS-CC, se sembró un fragmento de micelio de la cepa en estudio, en el centro de la superficie del agar y se incubó en estufa a 28 °C. Se observó el desarrollo de la colonia desde el día 7 hasta el día 30, documentándose las características del anverso y reverso de la colonia.

- Características microscópicas de la fase M:

De la misma manera que se realizaron los cultivos para evaluar las características macroscópicas de la fase M, se realizaron cultivos para disgregar el micelio y observar las características microscópicas. Transcurridos al menos 30 días, se disgregó una porción del micelio tomando con un ansa de gancho un trozo de aproximadamente 1-2 mm de la colonia en desarrollo y se lo colocó sobre un portaobjetos conteniendo una gota de lactofenol azul de algodón (LF-AA, Anexo). Utilizando dos ansas (gancho y aguja) se procedió a disgregar el material fúngico, se cubrió el disgregado con un cubreobjetos, se selló con barniz sintético y se examinó al microscopio óptico (Olympus BX41 400X).

- Conversión de la Fase Micelial (M) a Parasítica (P):

Para la conversión artroconidio → esférula se inocularon por cada cepa, cuatro tubos con medio glucosa-extracto de levadura (GYE, Anexo) y se incubaron a 28 °C. Semanalmente se observó la micromorfología de los cultivos hasta obtener las estructuras características del género. Cuando se observaron cultivos enriquecidos en los artroconidios característicos, se colocó sobre la superficie de la colonia varias gotas de medio líquido de Converse (Anexo). Se recogió la suspensión formada con pipeta Pasteur y se inoculó en cuatro tubos con medio de cultivo Converse. Se incubaron a 35-37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ de una a cuatro semanas. Semanalmente, se observaron microscópicamente preparados de estos cultivos de cada una de las cepas hasta el desarrollo de las esférulas.

- Producción y detección de exoantígeno:

Para detectar el exoantígeno específico de *Coccidioides* spp. se utilizó la técnica de inmunodifusión radial. La cepa a analizar se incubó en medio AS-CC por 7 a 10 días a 28 °C, hasta observar abundante desarrollo de micelio (aproximadamente

$\frac{3}{4}$ de la superficie del pico de flauta cubierta). Se subcultivó en caldo tripticasa-soya (CTS, Anexo) y se incubó en reposo durante 40 días a 28 °C. Una vez pasado ese periodo de incubación se tomaron 20 ml del sobrenadante del cultivo, se colocó en un tubo tipo Falcon de 50 ml y se centrifugó 10 min a 4000 rpm en una centrífuga Avanti J-26 XPI® (Coulter-Beckman, California, EE.UU.). Se tomó el sobrenadante con una jeringa de 20 ml, se clarificó a través de una unidad filtrante de 0.45 μ m de poro y luego se esterilizó a través de otra unidad filtrante de 0,22 μ m. El volumen filtrado se colectó en tubo cónico de 15 ml y se dejó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se retiró el tubo y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Se extrajo la alícuota descongelada de la parte superior, donde se encuentra el antígeno concentrado y se lo colocó en un tubo tipo Eppendorf de 2 ml. Se realizó la prueba de ID con sueros (2016/2) y antígenos (17180) de referencia producidos y estandarizados en el Servicio Miosis Profundas del Departamento Micología de la ANLIS. La difusión se realizó sobre portaobjetos preparados con 2,8 ml de agar fenolizado (Anexo).

Sobre esas placas, se realizaron esquemas de siete pocillos con perforadores de metal de 4 mm de diámetro (Figura 4.1). Se rellenaron los pocillos 1 y 4 con 20 μ l del antígeno control de referencia y el 7 con el suero de referencia. Los pocillos 2, 3, 5 y 6 se rellenaron con 20 μ l de los antígenos a analizar.

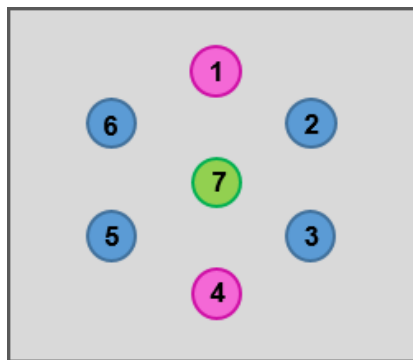


Figura 4.1: Esquema de pocillos. Posiciones de siembra para detección de exoantígeno

Las placas se incubaron en cámara húmeda a 25 °C durante 72 h para producir la inmunodifusión, luego de la cual, se podrá evaluar la presencia o ausencia de banda de precipitación.

Para mejorar la visualización de las bandas se procedió a su coloración como se describe a continuación. Las placas fueron lavadas con solución fisiológica citratada 5% durante 90 min y luego 3 veces con solución fisiológica durante 90 min cada lavado. Luego de un lavado final de 10 min con agua destilada, se cubrieron con un

papel de filtro y fueron secadas en una estufa a 50 °C toda la noche. Al día siguiente se retiró el papel de filtro y las placas se tiñeron durante 5 min con solución colorante y finalmente se destiñeron con solución decolorante hasta observación contrastada de las bandas de precipitación (Anexo).

Caracterización genética

- Extracción del ADN y determinación de su concentración:

Se extrajo ADN de los 54 aislados de *Coccidioides* spp. a partir de cultivos de 21 días en medio AS-CC y posterior subcultivo en caldo extracto de levadura (YE, Anexo).

Se inoculó una porción de micelio de cada una de las cepas en Erlenmeyer polimetilpenteno conteniendo caldo YE y se incubaron a 28 °C en agitación a 120 rpm. A los siete días de crecimiento todo el volumen del cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min y se conservó la masa micelial. Se realizaron cuatro lavados con solución fisiológica estéril resuspendiendo el pellet, de consistencia gelatinosa, por inversión del tubo. Luego del último lavado con pipeta Pasteur se tomó una alícuota del pellet (100 mg aproximadamente) y se colocó en crioviales de 2 ml conteniendo perlas de vidrio de 500 µm y 400 µl de *buffer* de lisis (AP1) del kit comercial DNeasy Plant Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemania). La suspensión fue sometida a disrupción mecánica en un homogeneizador de tejidos Precellys® 24 (Bertin technologies, Versailles, Francia) por 7 s a 5.000 rpm. Al producto obtenido se le agregaron 4 µl de RNAsa-A (100 mg/ml) y se incubó en bloque térmico a 65 °C por 10 min. Se prosiguió la extracción de ADN con el equipo Dneasy Plant Mini Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Brevemente, luego de la incubación en bloque térmico se adicionaron 130 µl de Buffer P3 y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se centrifugó el lisado 5 min a 13.200 rpm. Se transfirió el lisado a una columna y se centrifugó 2 min a 13.200 rpm. El ADN eluído a través de la columna se transfirió a otro tubo y se lavó con el agregado de 1,5 volúmenes de *buffer* AW1. Se transfirió el volumen a una segunda columna donde quedó retenido el ADN; este proceso se realizó en dos pasos separados por una centrifugación de 1 min a 8000 rpm. El ADN retenido en la columna se lavó 2 veces por agregado de 500 µl de *buffer* AW2. El primer lavado se centrifugó 1 min a 8000 rpm y el segundo lavado 2 min a 13.200 rpm. Finalmente, la columna con el ADN retenido se transfirió a un tubo

de 2 ml y se eluyó por el agregado de 50 µl de *buffer* AE incubando 10 min a temperatura ambiente y centrifugando 1 min a 8000 rpm.

La concentración del ADN se determinó por electroforesis en geles de 10 x 15 cm de agarosa 1% en *buffer* TAE 1X (Trizma Base 0,04 M, EDTA 0,001M, ácido acético 0,1%). Se sembraron en el gel 5 µl de ADN (2 µl de ADN + 3 µl H₂O grado biología molecular) en 6X DNA Loading Dye® (Thermo, Massachusetts, EE.UU.) y 4 µl del marcador de masa Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen, California, EE.UU.). La corrida se realizó durante 1 h a 100 Volts. Los geles fueron coloreados con solución de GelRed (Anexo) durante 20-30 min, lavados en agua destilada durante 15-20 min, observados en transiluminador y digitalizados por el sistema Gel Logic 212 PRO Carestream® (Labmate, Hertfordshire, Reino Unido). La estimación semicuantitativa de cada muestra se realizó por comparación visual de las imágenes fotodocumentadas comparándolas con el marcador de masa. Los ADN de todos los aislamientos se llevaron a una concentración final aproximada de 10 ng/µl y fueron mantenidos a -20 °C hasta el momento de uso.

- Amplificación del fragmento del gen *Ag2/PRA*:

A partir de los ADN obtenidos, se amplificó el fragmento de 526 pb del gen específico *Ag2/PRA* utilizando los *primers* diseñados por Bialek [Bialek *et al* 2004]:

Cocci I: 5'-GTACTATTAGGGAGGATAATCGTT-3' [841-864]

Cocci II: 5'-GGTGTCAACTGGTGGGATGTCAAT-3' [1366-1343]

La mezcla de reacción que se utilizó para la PCR fue: 5 µl de *buffer* 10X, 2,5 µl de Cl₂Mg 50 mM, 8 µl de dNTP 1,25 mM cada uno, 0,3 µl de Taq polimerasa 5 U/µl y 2 µl de cada primer Cocci I y Cocci II a una concentración de 25 µM en agua destilada csp 40 µl y 10 µl de ADN (aprox. 2 ng/µl). Las condiciones de la reacción fueron: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C, 1 min a 72 °C cada uno y un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C, en un termociclador GeneAmp PCR System 9700® (Applied Biosystems, California, EE.UU.). Todos los reactivos de la mezcla de reacción y los *primers* fueron Invitrogen, la albúmina y el agua utilizada -grado biológico, filtrada- Sigma (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.).

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de 10 x 15 cm de agarosa 2% en *buffer* TAE 1X sembrando 5 µl del producto en *loading*

buffer 6X, 2 µl del marcador de masa y 2 µl del marcador de peso molecular 100bp Gene Ruler 100 bp® (Fermentas, Massachusetts, EE.UU.). La corrida se realizó durante 1 h a 100 Volts. Los geles fueron coloreados con solución de GelRed durante 20-30 min, lavados en agua destilada durante 15-20 min, observados en transiluminador y digitalizados por el sistema Gel Logic 212 PRO Carestream. La estimación del tamaño y cantidad de los fragmentos obtenidos se realizó por comparación visual de las imágenes fotodocumentadas comparándolas con los marcadores sembrados.

- Amplificación de la región ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2):

A partir de los ADN obtenidos, se amplificaron las regiones ITS1 e ITS2 utilizando las combinaciones de *primers* (Genbiotech) diseñados por White que se describen en la Tabla 4.1 [White *et al.* 1990]:

Región genómica	Primer	Secuencia	Producto de PCR esperado
ADNr ITS1-5.8S-ITS2	ITS5 ITS4	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	672 bp
ADNr ITS1	ITS1 ITS2	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'	298 bp
ADNr ITS2	ITS3 ITS4	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3' 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	352 bp

Tabla 4.1: Combinaciones de *primers* utilizados para PCR de las regiones ITS. pb: pares de bases

La mezcla de reacción que se estandarizó para cada una de las PCR realizadas toma como base las descritas por Tintelnot *et al.* [2007] y Johnson *et al.* [2015] realizándose las modificaciones que se detallan en la Tabla 4.2.

	ADNr ITS1-5.8S-ITS2	ADNr ITS1	ADNr ITS2
buffer 10X	5 µl	5 µl	5 µl
Cl ₂ Mg 50 mM	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP c/u 1,25 mM	10 µl	10 µl	10 µl
Taq polimerasa 5 U/µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
primer FW 10 µM	ITS5: 1 µl	ITS1: 1 µl	ITS3: 1 µl
primer RV 10 µM	ITS4: 1 µl	ITS2: 1 µl	ITS4: 1 µl
DMSO 100%	-	2 µl	2 µl
H ₂ O destilada	22,5 µl	20,5 µl	20,5 µl

Tabla 4.2: Mezcla de reacción (45 µl) de PCR de las regiones ITS. FW: *primer forward*, RV: *primer reverse*. Todos los reactivos de la mezcla de reacción fueron Invitrogen y el agua utilizada Sigma.

En todos los casos se utilizaron 5 µl de ADN (aprox 2 ng/µl) y se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700. Las condiciones de la reacción dependieron de la región a amplificar y se optimizaron y modificaron a partir de los protocolos descritos por Johnson *et al.* [2015]. Las condiciones utilizadas se detallan en la Tabla 4.3.

	ADNr ITS1-5.8S-ITS2	ADNr ITS1	ADNr ITS2
Desnaturalización	94 °C 10 m	94 °C 10 m	94 °C 10 m
Desnaturalización	94 °C 1 m	94 °C 30 s	94 °C 30 s
Annealing	55 °C 1 m	55 °C 30 s	55 °C 30 s
Extensión	72 °C 1 m	72 °C 1 m	72 °C 1 m
	35 ciclos	30 ciclos	30 ciclos
Extensión final	72 °C 10 m	72 °C 10 m	72 °C 10 m

Tabla 4.3: Condiciones de las reacciones de PCR para las regiones ITS. Dependiendo de la región a amplificar. Luego de la extensión final todas las muestras fueron mantenidas a 4 °C hasta su análisis en gel.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de 10 x 15 cm de agarosa 2% en *buffer* TAE 1X sembrando 5 µl del producto en loading *buffer* 6X, 2 µl del marcador de masa y 2 µl del marcador de peso molecular 100bp. La corrida se realizó durante 1 h a 100 Volts. Los geles fueron coloreados con solución de GelRed durante 20-30 min, lavados en agua destilada durante 15-20 min, observados en transiluminador y digitalizados por el sistema Gel Logic 212 PRO Carestream. La estimación del tamaño y cantidad de los fragmentos obtenidos se realizó por comparación visual de las imágenes fotodocumentadas comparándolas con los marcadores sembrados.

- Purificación de productos de PCR

Los productos obtenidos en todas las reacciones de PCR se purificaron con el kit comercial AccuPrep® PCR Purification Kit (Bionner, Daejeon, Corea del Sur) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante con ligeras modificaciones. Brevemente, se tomaron 40 µl de la reacción de PCR y se adicionaron 200 µl de *buffer* 1, se transfirió esta mezcla a una columna y se centrifugó a 13.000 rpm por 1 min. El producto quedó retenido en la columna y se realizaron dos pasos de purificación consistentes en el agregado de 500 µl de *buffer* 2, seguido de centrifugación a 13.000 rpm por 1 min. Luego se realizó un paso de secado adicional de la columna centrifugando a 13.000 rpm por 1 min. Finalmente se agregaron de 30 a 50 µl de *buffer* 3, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se eluyó el producto purificado de PCR por centrifugación a 13.000 rpm 1 min.

El producto fue analizado por electroforesis en gel de agarosa de 10 x 15 cm 2% en *buffer* TAE 1X sembrando 5 µl del producto en loading *buffer* 6X, 4 µl del marcador de masa y 2 µl del marcador de peso molecular 100 bp. La corrida se realizó durante 1 h a 100 Volts. Los geles fueron coloreados con solución de gel red durante 20-30 min, lavados en agua destilada durante 15-20 min, observados en transiluminador y digitalizados por el sistema Gel Logic 212 PRO Carestream. La estimación del tamaño y cantidad de los fragmentos obtenidos se realizó por comparación visual de las imágenes fotodocumentadas comparándolas con los marcadores sembrados.

- Secuenciación y análisis

Con cada uno de los productos de PCR purificado se realizó la reacción de secuenciación con 1 µl del reactivo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), 1 µl del primer correspondiente (25 µM) y 2 µl del ADN molde (10-15 ng/µl en el caso de los fragmentos ITS1 e ITS2 y 15-25 ng/µl en el caso de la región *Ag2/PRA* y la región completa ITS1-ITS2) y agua destilada -grado biológico- csp 10 µl. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 con el siguiente programa: 40 ciclos de 10 s a 97 °C, 5 s a 50 °C y 4 min a 60 °C cada uno. El producto de esta reacción se purificó agregando al volumen de reacción 2 µl de acetato de sodio 3 M y 25 µl de etanol absoluto frío, se incubó a -20 °C 30 min y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 250 µl de etanol 70% frío, se realizó una nueva

centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Por último, se dejó secar el pellet a 56 °C y se envió para su secuenciación en un secuenciador de ADN automático ABI 3500 (Applied Biosystems) a la Plataforma de Secuenciación y Bioinformática del INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Las secuencias fueron amplificadas en ambas hebras “*forward*” y “*reverse*”. Las secuencias “*forward*” y “*reverse*” de cada secuencia de cada cepa fueron editadas y los cromatogramas fueron revisados visualmente utilizando el programa BioEdit v7.2.6 [Hall, 1999]. A partir del par “*forward*” y “*reverse*” de cada fragmento amplificado se generó una secuencia consenso para cada cepa.

Las secuencias consenso de cada fragmento amplificado (*Ag2/PRA*, ITS1 e ITS2) fueron comparadas con secuencias depositadas en la base de datos pública del GenBank utilizando el programa BLAST/n [Altschul *et al.*, 1990].

Utilizando el programa BioEdit se generó un nuevo archivo (para cada uno de los grupos de secuencias analizadas) con todas las secuencias consenso y se realizó un alineamiento múltiple mediante la aplicación “ClustalW Multiple alignment”. Para robustecer el análisis se incluyeron secuencias tipo y otras secuencias depositadas por diferentes autores, disponibles en el GenBank para *Ag2/PRA* e ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2) (Tabla 4.4)

Finalmente, utilizando el programa MEGA versión 6 [Tamura *et al.*, 2013], las secuencias se analizaron individualmente y sumando las tres regiones (*Ag2/PRA* + ITS1 + ITS2) generando una secuencia única.

Para elegir el modelo de sustitución nucleotídica más conveniente se analizaron las secuencias alineadas de cada región secuenciada junto con las secuencias de referencia elegidas mediante la opción “selección de modelo” del programa MEGA v6.0, utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud (Maximun Likelihood -lnL-) y otros criterios predeterminados por los autores. De la tabla generada se consideró como mejor modelo para describir patrones de sustitución a aquel que poseía menor valor BIC (Criterios de Información Bayesianos). Se generaron los árboles para cada uno de los grupos de secuencias analizadas con las correspondientes cepas importadas.

En el análisis global de la suma de las tres regiones, en el árbol generado solo se incluyó la secuencia de la cepa Silveira (Ag2/PRA: AF013256.1, ITS1-ITS2: KF539879.1), ya que el resto de las secuencias depositadas en el GenBank no tenían secuenciados los tres fragmentos analizados en este trabajo.

Ag2 PRA			
Cepa	Ubicación / Origen	Acceso GenBank	Referencia
Silveira <i>Cp</i>	CA, humano	AF013256.1	Peng <i>et al</i> 1999
RMSCC 2278 <i>Ci</i>	CA, humano	AY536445.1	Johannesson <i>et al</i> 2004
RMSCC 2346 <i>Cp</i>	MX, humano	AY536446.1	Johannesson <i>et al</i> 2004
M0104 <i>Cp</i>	MX, humano	JQ919960.1	Duarte Escalante <i>et al</i> 2013
M1204 <i>Cp</i>	MX, humano	JQ919961.1	Duarte Escalante <i>et al</i> 2013
M1404 <i>Cp</i>	MX, humano	JQ919962.1	Duarte Escalante <i>et al</i> 2013
M2305 <i>Cp</i>	MX, humano	JQ919964.1	Duarte Escalante <i>et al</i> 2013
M3805 <i>Ci</i>	MX, humano	JX306728.1	Luna-Isaac <i>et al</i> 2014
ITS1-5.8S-ITS2			
Cepa	Ubicación / Origen	Acceso GenBank	Referencia
RMSCC 2129 <i>Cp</i>	TX, humano	EF186785.1	Tintelnot <i>et al</i> 2007
RMSCC 1040 <i>Cp</i>	AZ, humano	EF186786.1	Tintelnot <i>et al</i> 2007
RMSCC 2395 <i>Ci</i>	CA, humano	EF186787.1	Tintelnot <i>et al</i> 2007
RMSCC 3505 <i>Ci</i>	MX, humano	EF186788.1	Tintelnot <i>et al</i> 2007
RMSCC 3476 <i>Ci</i>	MX, humano	EF186789.1	Tintelnot <i>et al</i> 2007
RMSCC 1040 <i>Ci</i>	MX, humano	EF186790.1	Tintelnot <i>et al</i> 2007
46 <i>Ci</i>	CA, humano	KF539861.1	Johnson <i>et al</i> 2015
K535 <i>Ci</i>	CA, humano	KF539867.1	Johnson <i>et al</i> 2015
K692 <i>Ci</i>	CA, humano	KF539868.1	Johnson <i>et al</i> 2015
K727 <i>Ci</i>	CA, humano	KF539872.1	Johnson <i>et al</i> 2015
M3429 <i>Ci</i>	CA, humano	KF539874.1	Johnson <i>et al</i> 2015
Silveira <i>Cp</i>	CA, Humano	KF539879.1	Johnson <i>et al</i> 2015
SL2 <i>Ci</i>	CA, león marino	KF539887.1	Johnson <i>et al</i> 2015
Wiskey Hill <i>Ci</i>	CA, suelo	KF539899.1	Johnson <i>et al</i> 2015

Tabla 4.4: Secuencias seleccionadas incluidas en el estudio. *Cp*: *Coccidioides posadasii*; *Ci*: *Coccidioides immitis*; CA: California; MX: México; TX: Texas; AZ: Arizona.

5. RESULTADOS

Microorganismos

Los principales datos de las cepas se presentan en la siguiente tabla:

Paciente	DMic	Año	Provincia que habitó o habita	Características del hospedero			
				Género	Edad	Forma clínica	Patología asociada
1	021091	2002	Jujuy	M	64	diseminada	antecedentes de TBC
2	073089	2006	Catamarca	F	16	diseminada	trasplante hepático
3	073094	2006	Mendoza	M	35	diseminada	N / I
4	073129	2007	Salta	M	7	diseminada	tratamiento por TBC
5	073130	2007	Catamarca	F	17	diseminada	trasplante renal
6	073131	2007	La Rioja	M	32	pulmonar	N / I
7	083376	2008	Catamarca	M	10	diseminada	tratamiento por TBC
8	083377	2008	Catamarca	M	45	diseminada	N / I
9	083378	2008	La Rioja	F	7	diseminada	N / I
10	083379	2008	VP-AE	F	60	pulmonar	N / I
11	083468	2005	Córdoba	M	89	diseminada	N / I
12	083470	2008	Catamarca	F	32	pulmonar	HIV+
13	093543	2008	Catamarca	M	16	pulmonar	N / I
14	093546	2008	Córdoba	M	16	diseminada	tratamiento por TBC
15	093637	2009	Santiago del Estero	F	46	diseminada	N / I
16	093656	2009	VP-AE	F	60	pulmonar	TBC
17	103714	1980-90*	San Luis	M	75	diseminada	N / I
18	103715	1980-90*	Catamarca	M	64	pulmonar	N / I
19	103716	1980-90*	San Juan	M	52	diseminada	N / I
20	103717	1980-90*	Córdoba	M	41	diseminada	N / I
21	103718	1980-90*	Catamarca	M	27	diseminada	N / I
22	103719	1980-90*	Catamarca	M	47	pulmonar	N / I
23	103720	1967	VP-AE	M	27	diseminada	N / I
24	103721	1980-90*	Santiago del Estero	M	57	pulmonar	N / I
25	103722	1980-90*	Santiago del Estero	M	48	pulmonar	DBT
26	103743 103744	2009	Catamarca	M	13	diseminada	N / I
27	103745 103747	2008	Catamarca	F	29	pulmonar	linfoma no Hodgking
28	103771 114075 114076	2009 2010	Catamarca	F	58	pulmonar	DBT, tto con corticoides
29	103827	2010	Catamarca	M	45	pulmonar	N / I
30	114029	2010	Catamarca	M	34	diseminada	trasplante renal
31	114072	2011	VP-AE	M	48	pulmonar	N / I
32	165294	2014	Mendoza	M	58	pulmonar	N / I
33	175709	2014	VP-AE	M	50	pulmonar	antecedentes de TBC
34	175710	2014	Catamarca	F	26	pulmonar	N / I
35	175711	2014	VP-AE	M	56	pulmonar	DBT, tto con corticoides
36	175712	2014	Catamarca	M	46	pulmonar	N / I
37	175713	2015	Catamarca	F	41	pulmonar	DBT
38	175714	2015	Catamarca	M	47	diseminada	neumonía
39	175715	2016	VP-AE	F	60	pulmonar	N / I
40	175716	2016	VP-AE	M	39	pulmonar	tto con ATBs y corticoides
41	175717	2017	Salta	M	37	diseminada	N / I
42	185670	2014	Catamarca	M	47	pulmonar	DBT, tto para TBC
43	972579 ‡	1997	Catamarca	M	3	diseminada	tto con ATBs y corticoides

Tabla 5.1: Datos de las cepas analizadas. Abreviaturas: VP-AE: Varias provincias de áreas endémicas, N/I: no se informa, F: femenino, M: masculino, DBT: diabetes, TBC: tuberculosis. Edad expresada en años. * Fecha de aislamiento, comunicación personal, Dr. Negroni. ‡ Cepa aislada de un canino [Iglesias Casal *et al.*, 2008].

Las cepas de origen mexicano analizadas en este trabajo corresponden a siete pacientes que residían en el Distrito Federal de México. Fueron remitidas desde origen identificadas como *Coccidioides immitis*. Como parte de la Colección DMic se identificaron con los siguientes números de cepario: 083277, 185673, 185674, 185675, 185676, 185677, 185678. El estudio de estas cepas a nivel genético fue realizado para confirmar la especie y obtener secuencias de *C. immitis* de las regiones analizadas en este trabajo.

Las cepas autóctonas fueron aisladas de pacientes que viven/vivieron y/o visitaron áreas de Argentina endémicas para CDM. Para el análisis se tuvo en cuenta el lugar de residencia o de visita previo a los síntomas de los pacientes. Ocho pacientes habitaron varias de las provincias ubicadas en el área endémica y el caso veterinario corresponde a la provincia de Catamarca. Estos nueve casos no fueron incluidos en el mapa de la Figura 5.1.

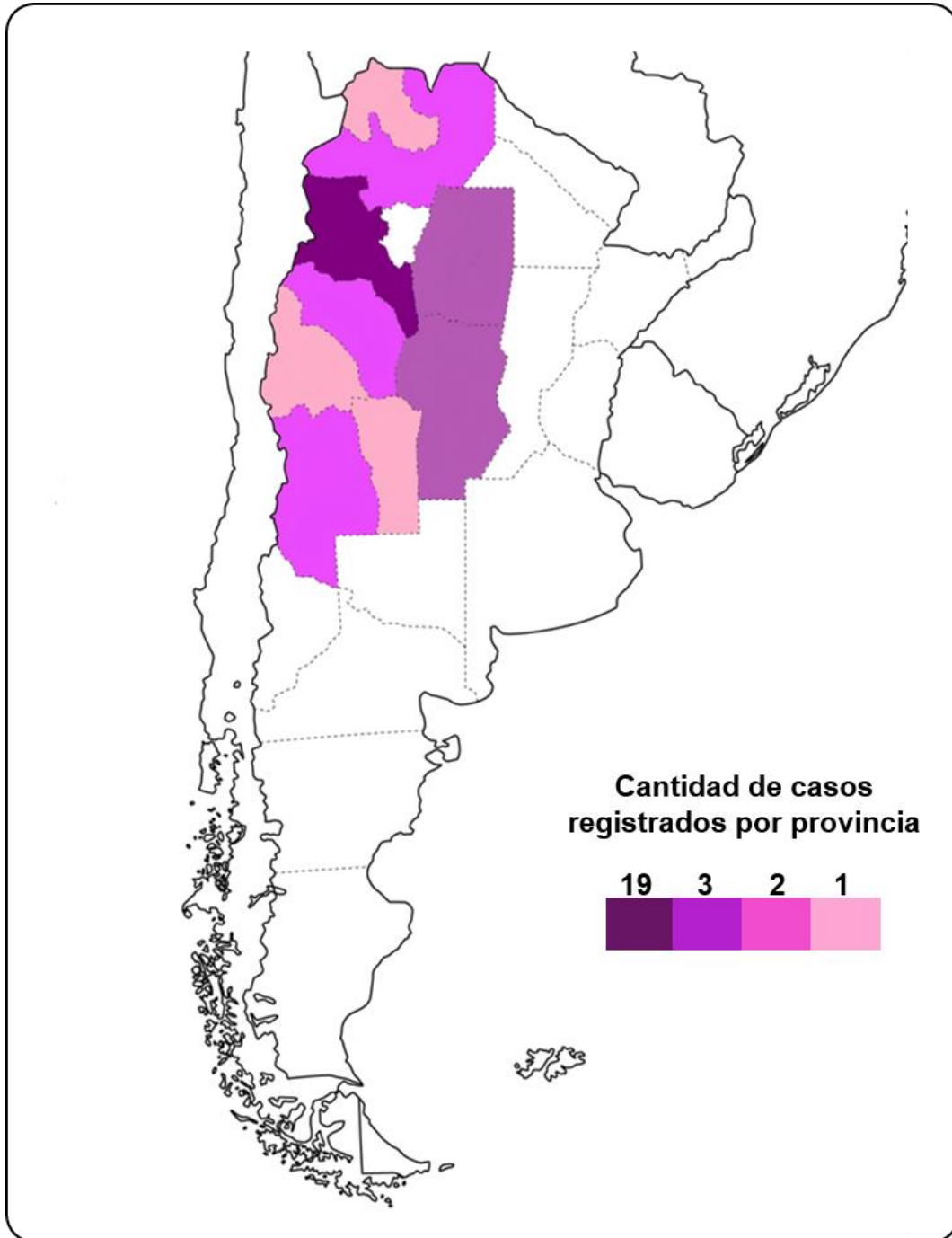


Figura 5.1: Distribución de casos por provincia. En 34 casos el probable sitio de infección fue documentado, de los nueve restantes: ocho visitaron a dos o más de estas provincias y uno es el caso veterinario, por lo que no se señalan en el mapa.

Los pacientes fueron la mayoría de género masculino y la relación de géneros fue 2,5/1. La mediana de edad fue de 45 años. Muchos realizaban tareas rurales o estaban expuestos a ambientes rurales.

El análisis de las formas clínicas de presentación de la CDM mostró que el 52% de los pacientes (n = 22) tenían formas pulmonares y el 48% (n = 20) formas diseminadas (Figura 5.2). El paciente veterinario, perro bóxer macho de 3 años con forma diseminada, no se incluye en estos porcentajes.

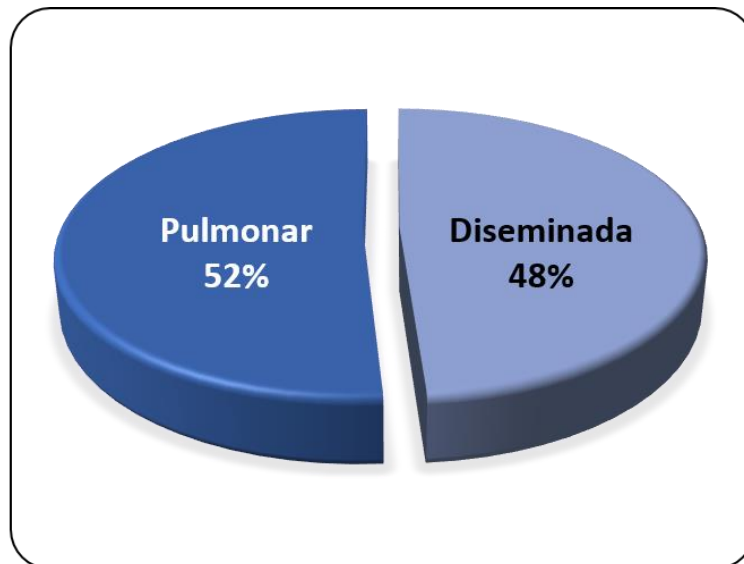


Figura 5.2: Distribución de la forma clínica. No se incluye el caso veterinario (n= 42).

Entre las formas diseminadas, es importante señalar que 8/20 pacientes presentaban las siguientes características: 3 pacientes estaban bajo tratamiento activo por tuberculosis (TBC), 3 pacientes estaban inmunosuprimidos debido a su condición de trasplantados de órganos sólidos, 1 paciente tenía antecedente de TBC y 1 paciente con antecedente de neumonía (Tabla 5.1). En las formas diseminadas fueron predominantes las lesiones cutáneas (n = 10). Además se observó un caso humano y el canino con diseminación ósea, un aislamiento de hígado y un caso en sistema nervioso central. Dos cepas fueron aisladas de hemocultivo y una de ganglio. Estos dos últimos aislamientos junto con los cuatro pacientes restantes, solo informan la forma diseminada sin detalle anatómico. Del total de los 42 pacientes 22 no informaron patología asociada.

Identificación fenotípica

- Características macroscópicas de la fase M

Todas las cepas presentaron características macroscópicas compatibles con el género *Coccidioides*. Desarrollaron micelios blancos, aéreos de textura algodonosa, con bordes continuos que se hicieron más evidentes luego de la segunda semana. El

reverso de todas las colonias fue de color marrón claro. En la Figura 5.3 se muestra la secuencia temporal -anverso y reverso- del cultivo de una cepa representativa.

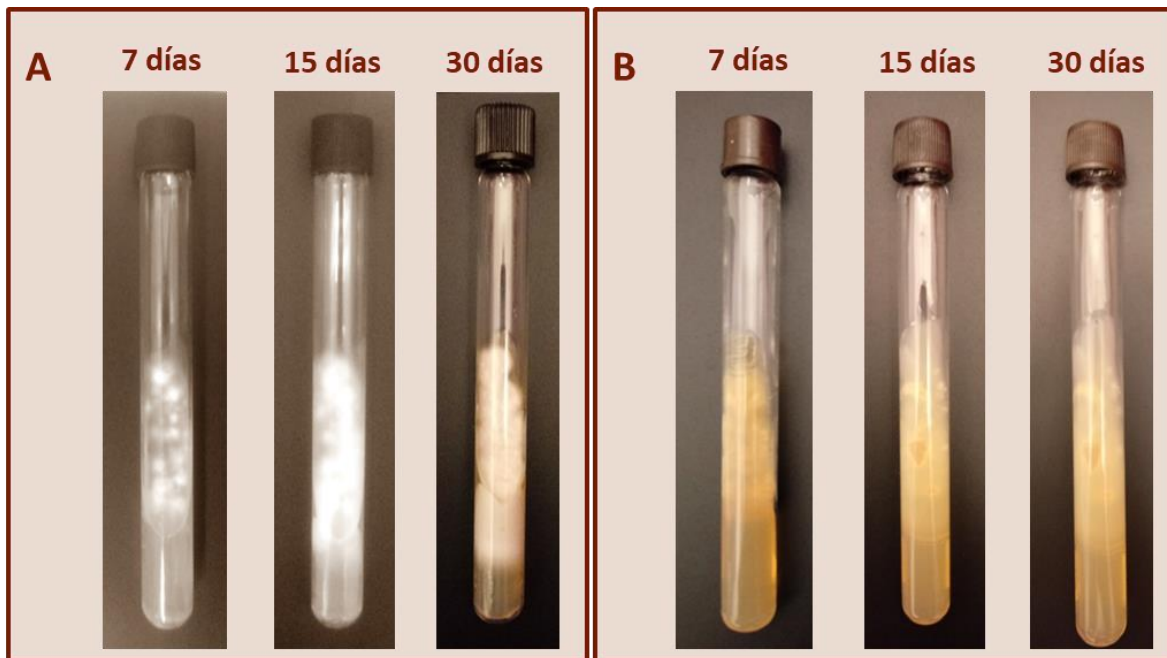


Figura 5.3: Características macroscópicas de *Coccidioides* spp. Cepa DMic 073131. Cultivos en AS-CC. **Panel A:** vista anverso, **Panel B:** vista reverso.

- Características microscópicas de la fase M

Como se describió en materiales y métodos, a partir del cultivo en fase M se realizaron extendidos para analizar la micromorfología. Todas las cepas presentaron los característicos artroconidios rectangulares intercalados con células vacías a partir del día 30. En la figura 5.4 se muestran preparados enriquecidos en artroconidios de una cepa representativa del total. En todas de las cepas analizadas el tiempo requerido para obtener cultivos enriquecidos en artroconidios fue de 40 a 50 días.

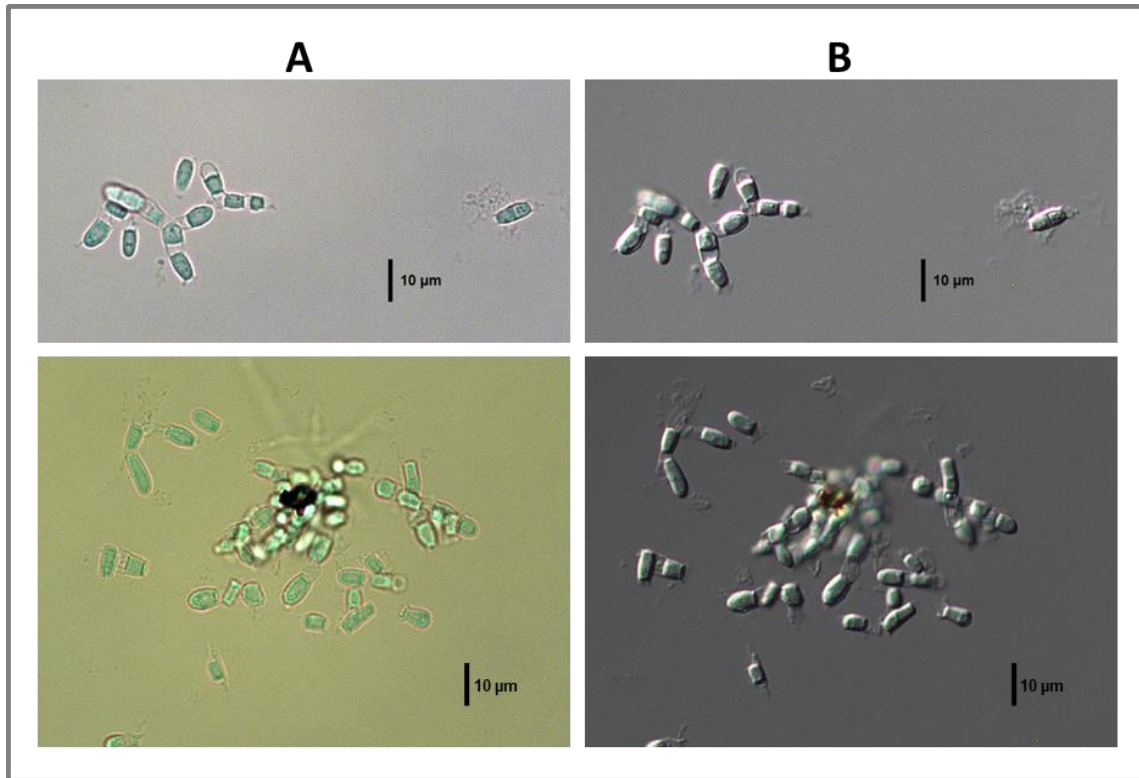


Figura 5.4: Características microscópicas al día 40. Cepa DMic 103771. Extendidos en LF-AA, 400X
Panel A: observación con luz blanca foto superior con ajuste de blancos, foto inferior vista sin ajuste.
Panel B: los mismos preparados observados con función DIC (Microscopía de Contraste Interferencial-Diferencial)

- Conversión de la Fase Micelial (M) a Parasítica (P):

A partir de un cultivo enriquecido en artroconidios de 40 días de evolución, se realizó la conversión de fase *in vitro* en medio Converse. Todas las cepas caracterizadas en este trabajo comenzaron a mostrar artroconidios agrandados, de aspecto globoso, con engrosamiento de la pared a los 21 días (Figura 5.5 A). Veinte días después se comenzó a observar esferas aisladas con pared engrosada de aproximadamente 5 a 10 µm de diámetro (Figura 5.5 B). Finalmente entre los días 50 y 60 de incubación se observaron esférulas de mayor tamaño, 15-20 µm, compatibles con el estadio de esférula inmadura (Figura 5.5 C).

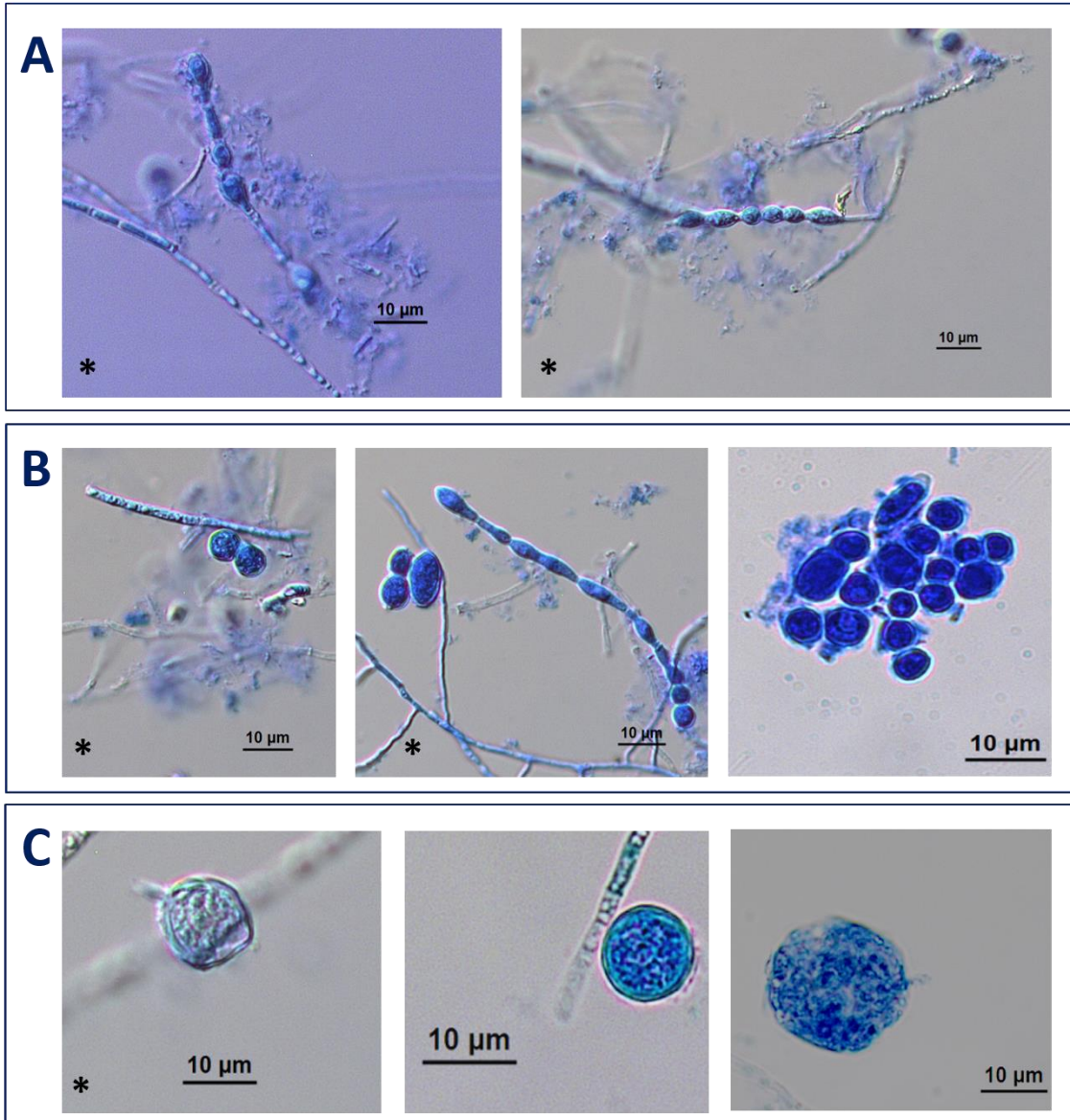


Figura 5.5: Conversión de artroconidio → esférula. Cepa DMic 103718. Preparados en LF-AA, 400X
Panel A: cultivos de 21 días. **Panel B:** cultivos de 35-40 días. **Panel C:** Cultivos de 50-60 días. * Fotos tomadas con los preparados observados con función DIC (Microscopía de Contraste Interferencial-Diferencial)

- Producción y detección de exoantígeno

Las 54 cepas cultivadas en CTS durante 40 días y evaluadas para la producción de exoantígeno mostraron la banda de precipitación específica con identidad frente a suero y antígeno de referencia. En la Figura 5.6 se muestra una inmunodifusión radial de 4 cepas representativas del total analizado.

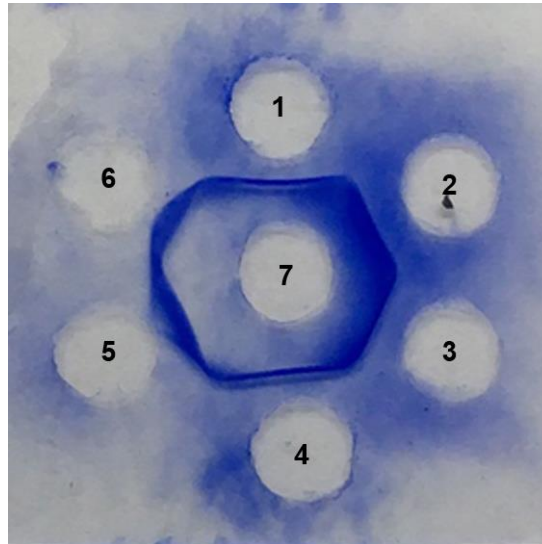


Figura 5.6. Producción de exoantígenos de diferentes cepas de *Coccidioides* spp. Se puede observar la banda de identidad en el extracto antigénico de cuatro de los aislados analizados (pocillo 2, 3, 5 y 6). Pocillo 1 y 4: antígeno de referencia INM 17180. Pocillo 7 suero de referencia anti-*Coccidioides* hecho en conejo INM 2016/2. Teñido con azul de Coomassie R-250. Se compara con la banda de precipitación específica que tiene identidad con suero y antígeno de referencia.

Caracterización genética

- Extracción de ADN y determinación de su concentración:

Se evaluó la cantidad y la calidad del ADN obtenido de cada cepa mediante visualización en el gel de agarosa. La Figura 5.7 muestra, a modo de ejemplo, la concentración de ADN determinada por comparación visual de la intensidad de la banda con el marcador de masa. Se utilizaron para las pruebas ADN con concentraciones entre 10-20 ng/ μ l, en casos de menor concentración la extracción de ADN fue repetida; en los casos de concentraciones mayores se diluyó el ADN hasta obtener la concentración óptima. Los ADN fueron conservados a -20 °C debidamente rotulados y con la concentración correspondiente.

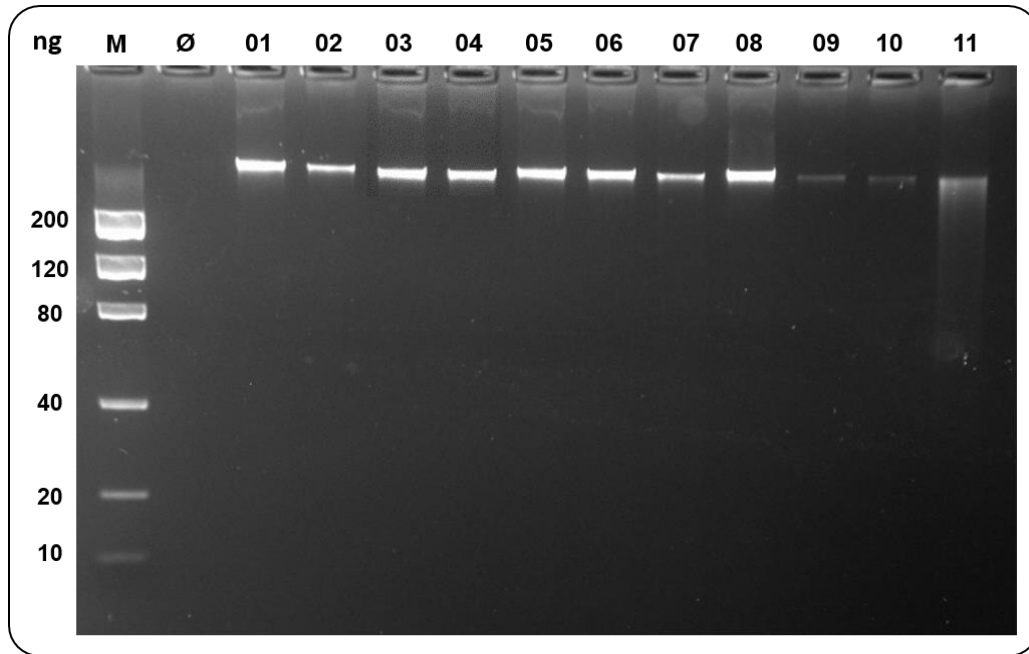


Figura 5.7 Cuantificación del ADN de *Coccidioides* spp. M: Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen). Ø: calles sin siembra, **01:** 972579, **02:** 175716, **03:** 103722, **04:** 103719, **05:** 073130, **06:** 083277, **07:** 165294, **08:** 185673, **09:** 083376, **10:** 093656, **11:** 093543. A la izquierda de la figura se señalan los ng de ADN por banda en el volumen sembrado.

- Amplificación del fragmento del gen *Aq2/PRA*:

Los productos de PCR fueron amplificados y analizados por electroforesis en gel (Figura 5.8). Los ADN de todas las cepas mostraron una banda de $\cong 500$ pb. Esta banda es presuntiva para el género *Coccidioides* ya que no se evidencia cuando se utiliza esta PCR para otros miembros del orden *Onygenales*. Esta metodología es utilizada para identificación a nivel de género en nuestro laboratorio ya que no permite identificar las especies por su patrón de bandas.

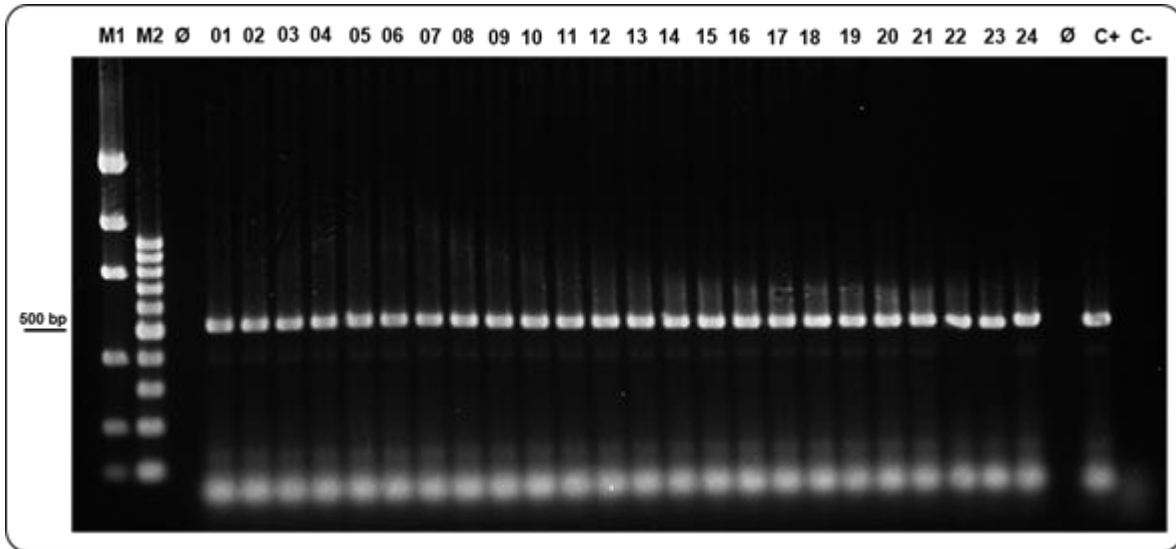


Figura 5.8: Producto de la PCR que amplifica un fragmento del gen *Ag2/PRA*. Todas las cepas analizadas mostraron un fragmento de $\cong 500$ bp. **M1:** Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen). **M2:** Gene Ruler 100 bp® (Fermentas). **Ø:** calles sin siembra, **C+:** control positivo, **C-:** control mix, **01:** 103721, **02:** 103717, **03:** 103722, **04:** 103719, **05:** 175714, **06:** 175711, **07:** 165294, **08:** 103747, **09:** 185670, **10:** 103714, **11:** 114072, **12:** 103720, **13:** 103745, **14:** 083468, **15:** 093656, **16:** 093637, **17:** 093543, **18:** 175712, **19:** 175716, **20:** 972579, **21:** 073130, **22:** 083376, **23:** 083277, **24:** 185673.

- Amplificación de la región ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2):

Como se describió en materiales y métodos, parte de las cepas analizadas (14) fueron amplificadas por PCR utilizando la región completa (ITS1-5.8S-ITS2), el resto de las cepas se analizaron realizando las PCRs de la región ITS1 e ITS2 por separado cuyos productos de amplificación son de 298 pb y 352 pb respectivamente. Luego de la reacción de PCR de cada una de las regiones ITS se analizaron los productos obtenidos en gel de agarosa. En la Figura 5.9 se muestra un gel representativo de las amplificaciones por separado de todas las cepas analizadas. La visualización de las bandas de esta región no permite ningún tipo de identificación ya que es común no sólo a ambas especies de *Coccidioides* sino a otros géneros de hongos.

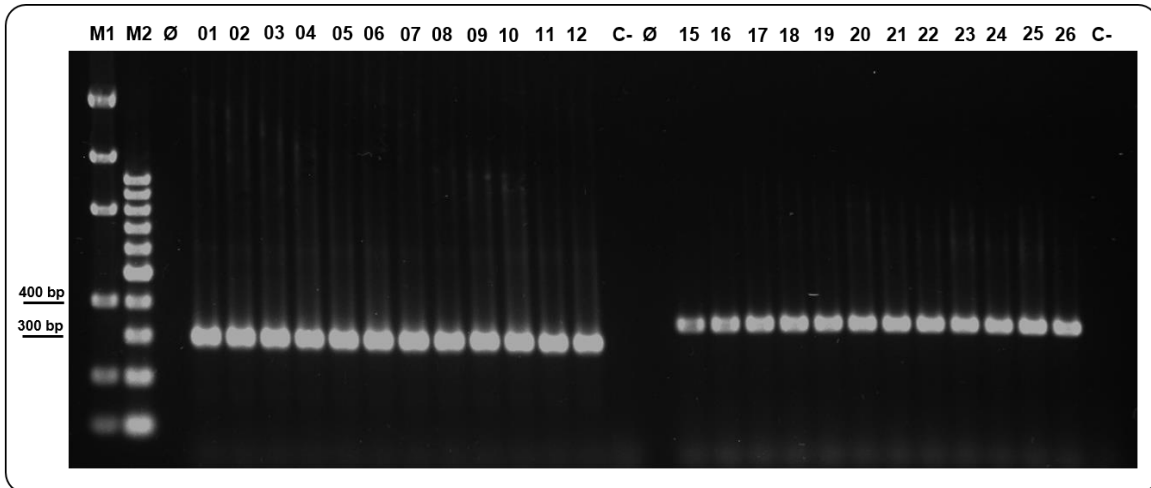


Figura 5.9: Producto de la PCR que amplifica los fragmentos ITS. M1: Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen). M2: Gene Ruler 100 bp® (Fermentas). Ø: calles sin siembra, C-: control mix. **ITS1** 01: 103743, 02: 114075, 03: 083379, 04: 175717, 05: 972579, 06: 175711, 07: 103718, 08: 073089, 09: 073094, 10: 073131, 11: 175712, 12: 083277. **ITS2** 15: 103743, 16: 114075, 17: 083379, 18: 175717, 19: 972579, 20: 175711, 21: 103718, 22: 073089, 23: 073094, 24: 073131, 25: 175712, 26: 083277.

Todos los productos amplificados fueron purificados con el kit comercial de la manera descrita en materiales y métodos para su posterior secuenciación.

- Secuenciación y análisis:

Las secuencias consenso del fragmento del gen *Ag2/PRA* de cada una de las cepas analizadas fueron de entre 490 a 528 pb.

Para las secuencias ITS, en 14 cepas se pudo amplificar el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 completo y los productos fueron de 650 a 660 pb. En las restantes 40 cepas (34 *C. posadasii* y 6 *C. immitis*) fue necesario amplificar separadamente los fragmentos, los que tuvieron tamaños de 270 a 302 pb para la región ITS1 y 290 a 350 pb para la región ITS2.

Cada una de las secuencias consenso del gen *Ag2/PRA* y de los ITS1 e ITS2 fueron comparadas con secuencias depositadas en el GenBank utilizando la herramienta BLAST/n.

En la Figura 5.10 se muestran los alineamientos para el fragmento del gen *Ag2/PRA* de una cepa autóctona representativa del total 46/47 (A) y de la única cepa que mostró un nucleótido de diferencia entre las 47 analizadas (B).

A Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate 0 83376 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819989.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate 0 73130 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819987.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate SIFe proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819982.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate MA proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819981.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate HU18 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819975.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate M2805 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819965.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate M3905 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	861	861	100%	0.0	99%	JQ819967.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate M2305 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	856	856	100%	0.0	99%	JQ819964.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides immitis proline rich antigen (PRA) gene, complete cds	856	856	100%	0.0	99%	AF013256.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii proline-rich antigen (pra) gene, complete cds	856	856	100%	0.0	99%	AY536446.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides immitis antigen 2 protein gene, complete cds	856	856	100%	0.0	99%	U51200.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii strain M39-05 proline-rich antigen (pra) gene, partial cds	839	839	96%	0.0	100%	JX306725.1

B Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate M2305 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	856	856	100%	0.0	100%	JQ819964.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides immitis proline rich antigen (PRA) gene, complete cds	856	856	100%	0.0	100%	AF013256.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii proline-rich antigen (pra) gene, complete cds	856	856	100%	0.0	100%	AY536446.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides immitis antigen 2 protein gene, complete cds	856	856	100%	0.0	100%	U51200.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate 0 83376 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	850	850	100%	0.0	99%	JQ819989.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate 0 73130 proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	850	850	100%	0.0	99%	JQ819987.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate SIFe proline-rich-antigen (pra) gene, partial cds	850	850	100%	0.0	99%	JQ819982.1

Figura 5.10: Resultado del análisis del fragmento del gen *Ag2/PRA* en BLAST. A. DMic 114072, cepa representativa de 46 similares **B.** DMic 175717. Las secuencias U51200.1 y AF013256.1 corresponden a la cepa Silveira (cepa tipo de *C. posadasii*), depositadas en el GenBank en los años 1996 y 1999, respectivamente, cuando no se habían descrito ambas especies.

Todas las secuencias de cepas autóctonas tuvieron una identidad del 99% y 100% de cobertura con varias secuencias de *C. posadasii* depositadas en GenBank (Figura 5.10 A). La cepa DMic 175717 que mostró diferencia en una base con respecto al resto de las autóctonas, tuvo 100% de identidad y 100% de cobertura con secuencias de *C. posadasii* aisladas de pacientes mexicanos y con la cepa Silveira (cepa tipo aislada de paciente californiano) (Figura 5.10 B). El análisis de este fragmento permitió identificar nuestras cepas como *C. posadasii*. Los aislamientos 083376 y 073130 corresponden a aislamientos argentinos analizados por otros autores en México. A su vez, nuestras secuencias tuvieron 96% de identidad y menos del 99% de cobertura con las de *C. immitis*.

Las 47 cepas de *C. posadasii* analizadas fueron similares entre sí en el análisis de los fragmentos ITS y estos fragmentos también permitieron identificar las especies.

En las Figuras 5.11 se muestran los porcentajes de similitud de las regiones ITS1 (A) e ITS2 (B) de una de las secuencias de *C. posadasii* analizadas en este estudio (representativa del grupo).

A Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 54196	597	597	99%	7e-167	100%	AB232901.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45817	597	597	99%	7e-167	100%	AB232892.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45813	597	597	99%	7e-167	100%	AB232889.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 4945	597	597	99%	7e-167	100%	AB232884.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 4935	597	597	99%	7e-167	100%	AB232883.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii clone SS06UM-H2A.C2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA	592	592	99%	3e-165	99%	KF386150.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii clone SS06UM-H2A.P 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, complete sequence, and	592	592	99%	3e-165	99%	KF386148.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 50993	592	592	99%	3e-165	99%	AB232895.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides immitis gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45816	592	592	99%	3e-165	99%	AB232891.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45809	592	592	99%	3e-165	99%	AB232885.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii strain Silveira 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and int	586	586	99%	1e-163	99%	KM588216.1

B Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii isolate 6CIH internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	660	660	100%	0.0	100%	KY399886.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 50993	660	660	100%	0.0	100%	AB232895.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45817	660	660	100%	0.0	100%	AB232892.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45813	660	660	100%	0.0	100%	AB232889.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 4945	660	660	100%	0.0	100%	AB232884.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45809	660	660	100%	0.0	100%	AB232885.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii strain Silveira 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	654	654	100%	0.0	99%	KM588216.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii clone S1203408.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	654	654	100%	0.0	99%	KF373786.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 54196	654	654	100%	0.0	99%	AB232901.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides immitis gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45816	654	654	100%	0.0	99%	AB232891.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii gene for 18S rRNA ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 4935	654	654	100%	0.0	99%	AB232883.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii clone S1203408.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	649	649	100%	0.0	99%	KF373787.1
<input type="checkbox"/> Coccidioides posadasii strain NCCPF 230018 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	645	645	99%	0.0	99%	JX964799.1

Figura 5.11: Resultado del análisis de las regiones ITS en BLAST. A. región ITS1 B. región ITS2.

Todas las cepas autóctonas tuvieron una identidad del 100% y 100% de cobertura con varias secuencias de *C. posadasii* depositadas en GenBank para ITS1 e ITS2.

Adicionalmente, se confirmó que las siete cepas de pacientes de México depositadas en nuestra colección y analizadas en este trabajo eran *C. immitis*, tanto en el análisis del gen *Ag2/PRA*, así como en las regiones ITS1 e ITS2 con 99-100% de identidad y 100% de cobertura para cada una de las tres regiones estudiadas.

Posteriormente, las secuencias de las tres regiones analizadas conjuntamente con las de referencia, se alinearon utilizando el programa BioEdit.

En la Figura 5.12 se muestran las posiciones donde se observaron sustituciones/deleciones en las secuencias del gen *Ag2/PRA*, en comparación con la secuencia de la cepa de referencia Silveira (AF013256.1). Cuarenta y seis cepas de *C. posadasii* de pacientes argentinos son 100% idénticas entre sí y difieren de la cepa Silveira en un nucleótido en la posición 1228 (G → C). Una cepa aislada en 2017, de un paciente de la provincia de Salta (DMic 175717) es 100% idéntica a la cepa tipo y a dos cepas de origen mexicano depositadas en el GenBank (AY536446.1 y JQ919964.1). Las siete cepas de *C. immitis* analizadas en la región *Ag2/PRA* son 100% idénticas a la secuencias de *C. immitis* AY 536445.1 de CA y JX 306728.1 de MX depositadas en el GenBank.

En la Figura 5.13 se muestran las posiciones donde se observaron sustituciones/deleciones en la secuencia ITS1, comparadas también con la cepa Silveira. Todas las cepas de *C. posadasii* de pacientes de Argentina fueron idénticas entre sí y con las cepas de TX (EF186785.1) y AZ (EF186786.1) pero difieren en un nucleótido en la posición 125 (C→T) con la cepa Silveira (KF539879.1). De las siete cepas de *C. immitis* analizadas en este trabajo, seis son idénticas entre sí y coinciden con las 11 secuencias importadas del GenBank y utilizadas para enriquecer el análisis. Una cepa (DMic 185673) aislada de un paciente en el Estado de México (región fuera del área endémica descrita para *C. immitis* en MX) presenta una deleción de 15 nucleótidos en posición 101-115.

En la Figura 5.14 se muestran las posiciones donde se observaron sustituciones/deleciones en la secuencia ITS2, comparadas también con la cepa Silveira. Todas las cepas de *C. posadasii* de aislamientos de pacientes de Argentina fueron idénticas entre sí y con las cepas de aislamientos de TX (EF186785.1), AZ (EF186786.1) y la cepa Silveira (KF539879.1). Las siete cepas de *C. immitis* analizadas en este trabajo, son similares entre sí y con las secuencias importadas del GenBank, observándose en ellas los distintos polimorfismos descritos y caracterizados para esta especie.

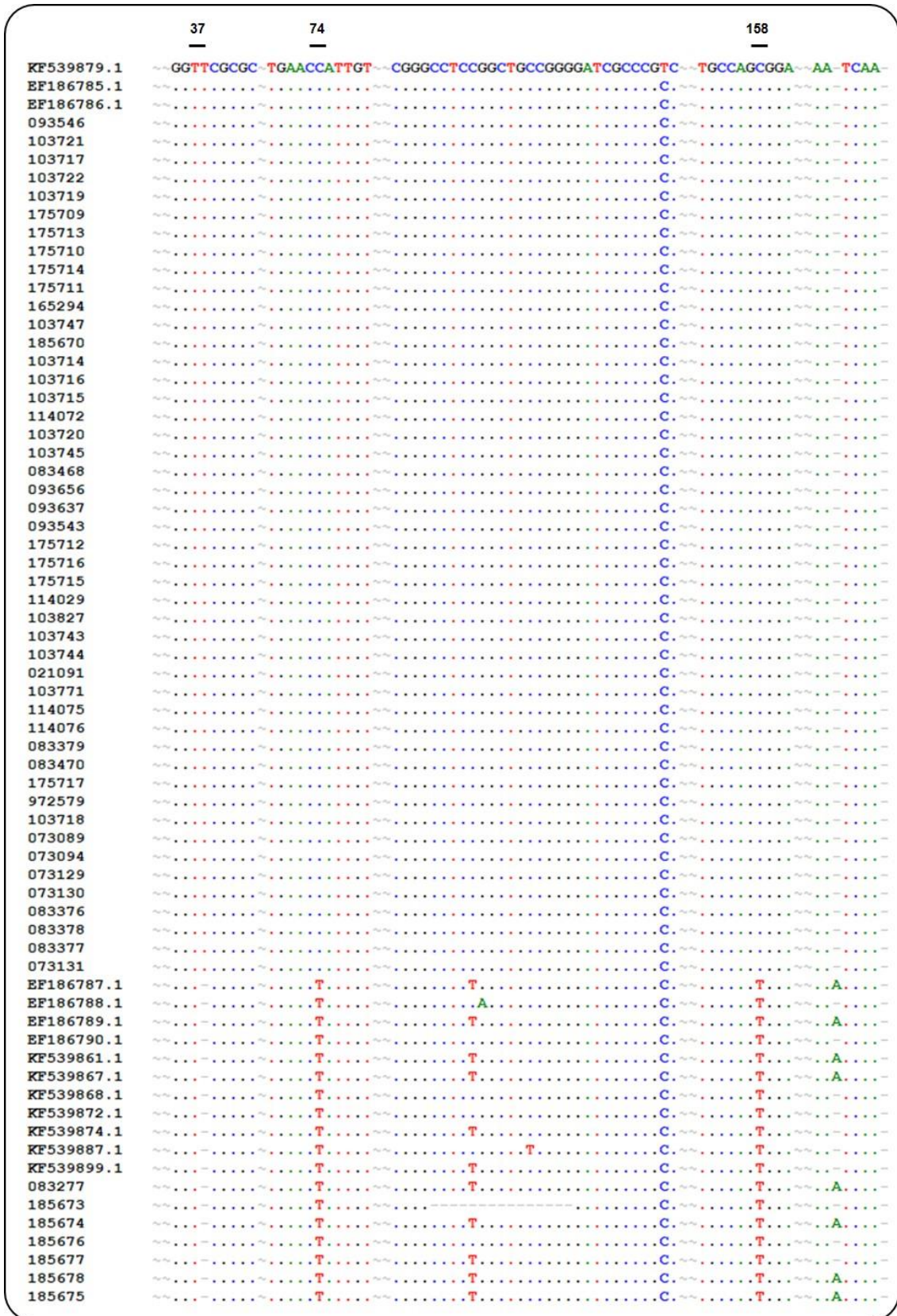


Figura 5.13: Alineamientos de las secuencias de ITS1 (219 nt). –: deleción, ~: ausencia de bases por recorte, •: nucleótidos idénticos. Los números indican las posiciones en la secuencia de nucleótidos en la cepa 46 (KF539861.1) de la región ITS1.



Figura 5.14: Alineamientos de las secuencias de ITS2 (169 nt). -: deleción, ~: ausencia de bases por recorte, *: nucleótidos idénticos. Los números indican las posiciones en la secuencia de nucleótidos en la cepa 46 (KF539861.1) de la región ITS2.

El análisis utilizando el programa MEGA determinó que el mejor modelo de sustitución nucleotídica para la región del gen *Ag2/PRA* (399 nucleótidos) fue Jukes-Cantor. El árbol generado mediante Neighbor-Joining permitió observar dos ramas bien definidas correspondientes a cada una de las especies de *Coccidioides* (Bootstrap: 98%). La rama que agrupa *C. posadasii*, contiene el total de cepas argentinas. Sólo una cepa de paciente de Argentina, DMic175717, segrega en un subgrupo (Bootstrap: 64%) junto con la secuencia AF013256.1 (cepa Silveira) y dos cepas de pacientes de México, (AY536446.1 y JQ919964.1). En este análisis las cepas de *C. immitis* son clonales (Figura 5.15).

Para la región ITS1 (219 nucleótidos) el modelo utilizado fue Tamura-3 parámetros. El árbol generado mediante Neighbor-Joining (Figura 5.16) permitió observar dos ramas bien definidas correspondientes a cada una de las especies de *Coccidioides* (Bootstrap: 88%). La rama que agrupa *C. posadasii*, contiene el total de cepas argentinas. En la especie *C. posadasii* aparecen dos ramas asociadas a la diferencia en un nucleótido; una de las ramas contiene la cepa de Argentina, DMic175717 (T en posición 19 vs C en el resto de las cepas) y la otra rama contiene la secuencia KF539879.1 (cepa Silveira) (T en posición 125 vs C en el resto). Las cepas *C. immitis* tanto las importadas del GenBank como las analizadas en este trabajo presentan ciertas diferencias dentro de la especie, formándose varias ramas, sólo una de ellas, la más numerosa, con características de subgrupo (Bootstrap: 66%).

En la Figura 5.17 se observa el árbol Neighbor-Joining resultante del análisis de la región ITS2 (169 nucleótidos) con el modelo de Jukes-Cantor. Se definen dos ramas correspondientes a cada una de las especies de *Coccidioides* (Bootstrap: 89%). La rama que agrupa *C. posadasii*, contiene el total de las cepas argentinas analizadas y que son idénticas entre sí y con la secuencia ITS2 de la cepa Silveira. En relación a las cepas *C. immitis*, al igual que con la región ITS1, se forman varias ramas dentro de la especie, teniendo dos de ellas valores de bootstrap de 54 y 55%.

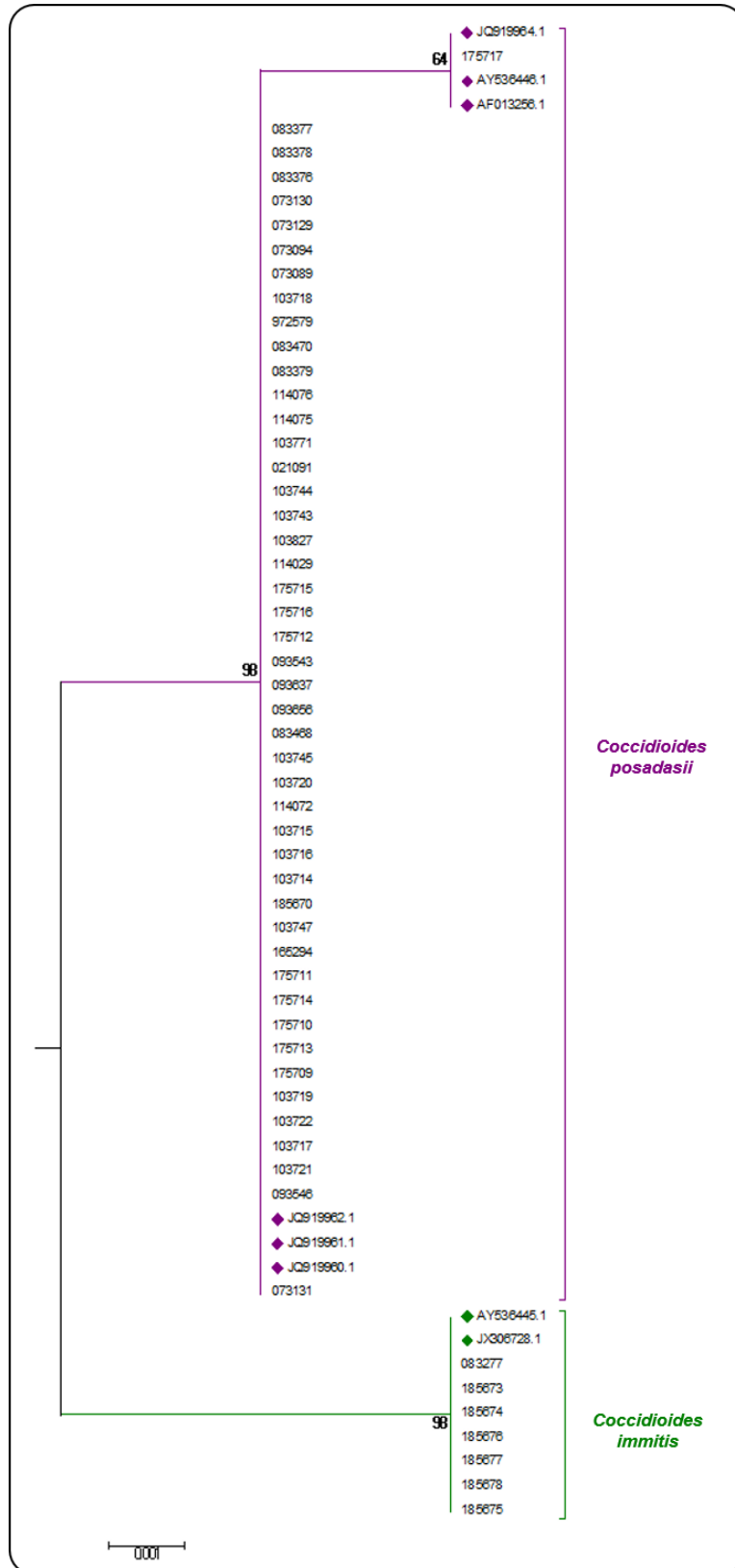


Figura 5.15: Árbol de relaciones evolutivas entre el género para la región Ag2/PRA (399 nt). Inferido por el método Neighbor-Joining y generado por el programa MEGA V6.0. Bootstrap: 1000. ♦ Secuencias importadas del GenBank.

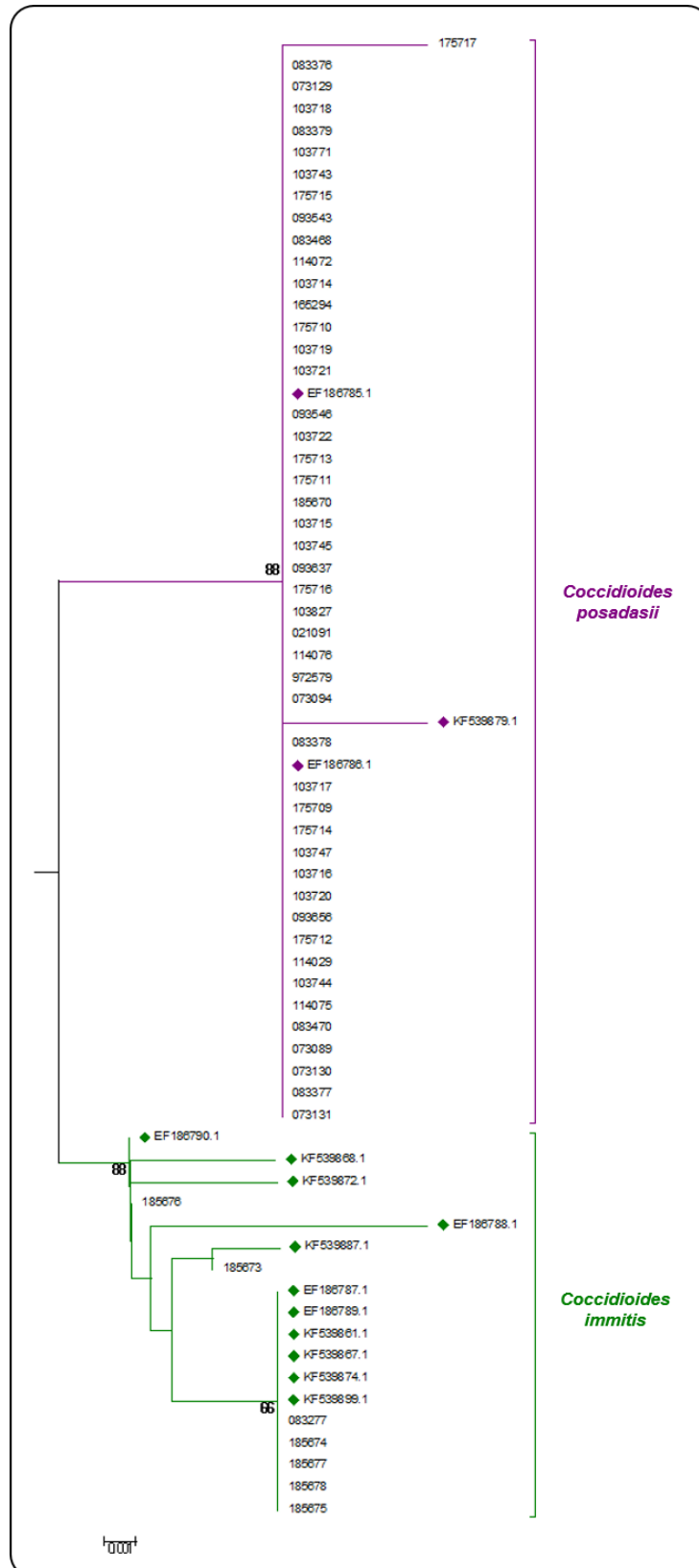


Figura 5.16: Árbol de relaciones evolutivas entre el género para la región ITS1 (219 nt). Inferido por el método Neighbor-Joining para la región y generado por el programa MEGA V6.0. Bootstrap: 1000. ◆ Secuencias importadas del GenBank Solo se indican las frecuencias en las ramas cuando el valor fue superior al 50%.

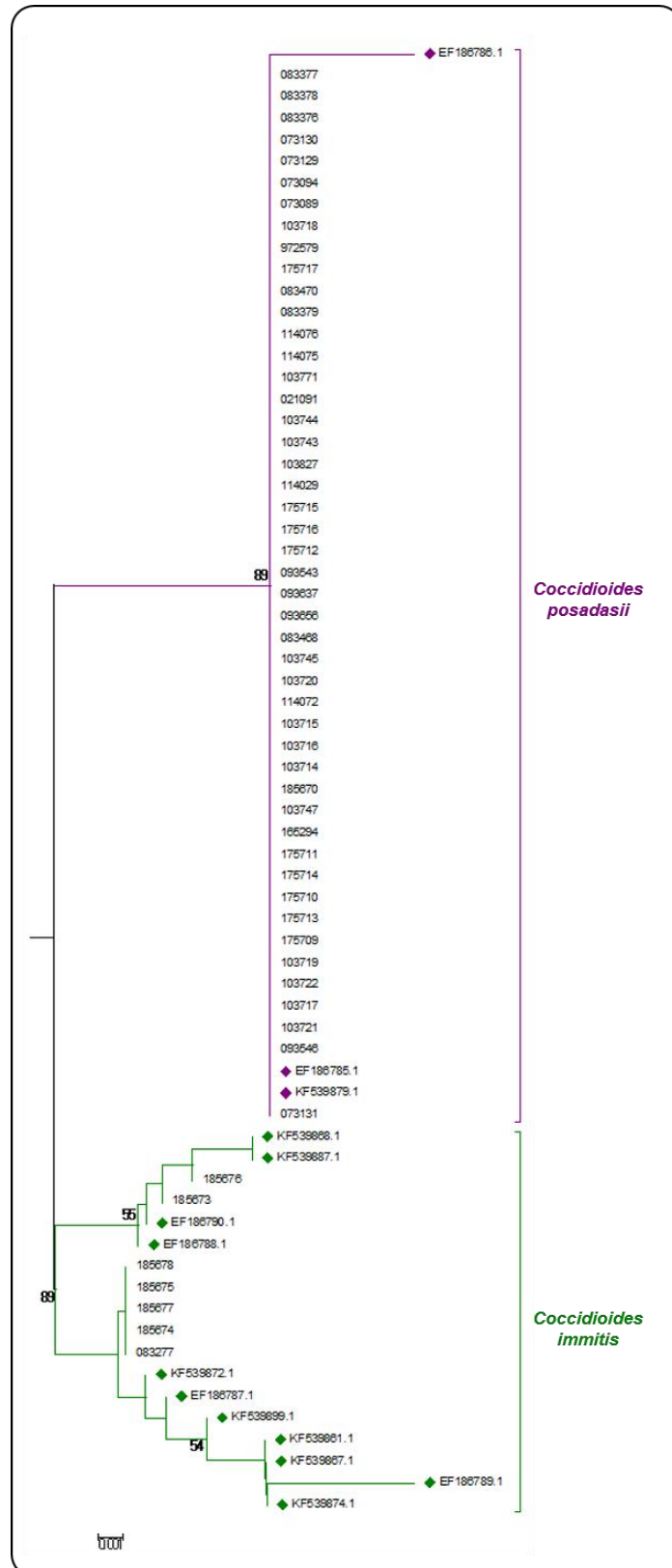


Figura 5.17: Árbol de relaciones evolutivas entre el género para la región ITS2 (169 nt). Inferido por el método Neighbor-Joining y generado por el programa MEGA V6.0. Bootstrap: 1000. ♦ Secuencias importadas del GenBank. Solo se indican las frecuencias en las ramas cuando el valor fue superior al 50%.

Cuando se realizó el análisis múltiple de las secuencias (*Ag2/PRA* + ITS1 + ITS2: 787 nucleótidos), se determinó que el mejor modelo de sustitución nucleotídica es Jukes-Cantor. Se comparó con la cepa Silveira, ya que las secuencias de las tres regiones estaban depositadas solo para ésta (AF013256.1 para el gen *Ag2/PRA* y KF539879.1 para las regiones ITS). En la Figura 5.18 se muestra el árbol obtenido realizado con el método Neighbor-Joining. El análisis múltiple confirmó lo observado en cada uno de los análisis individuales, definiéndose dos ramas que se correspondieron a cada una de las especies (Bootstrap: 100%). Todas las cepas de aislamientos de pacientes de Argentina agruparon en la rama de *C. posadasii*. Dentro de esta especie, se observa una rama en la que agrupan la cepa DMic 175717 junto con la cepa Silveira (Bootstrap: 65%). Para la especie *C. immitis*, se formaron dos ramas (Bootstrap de 54% y 86%).

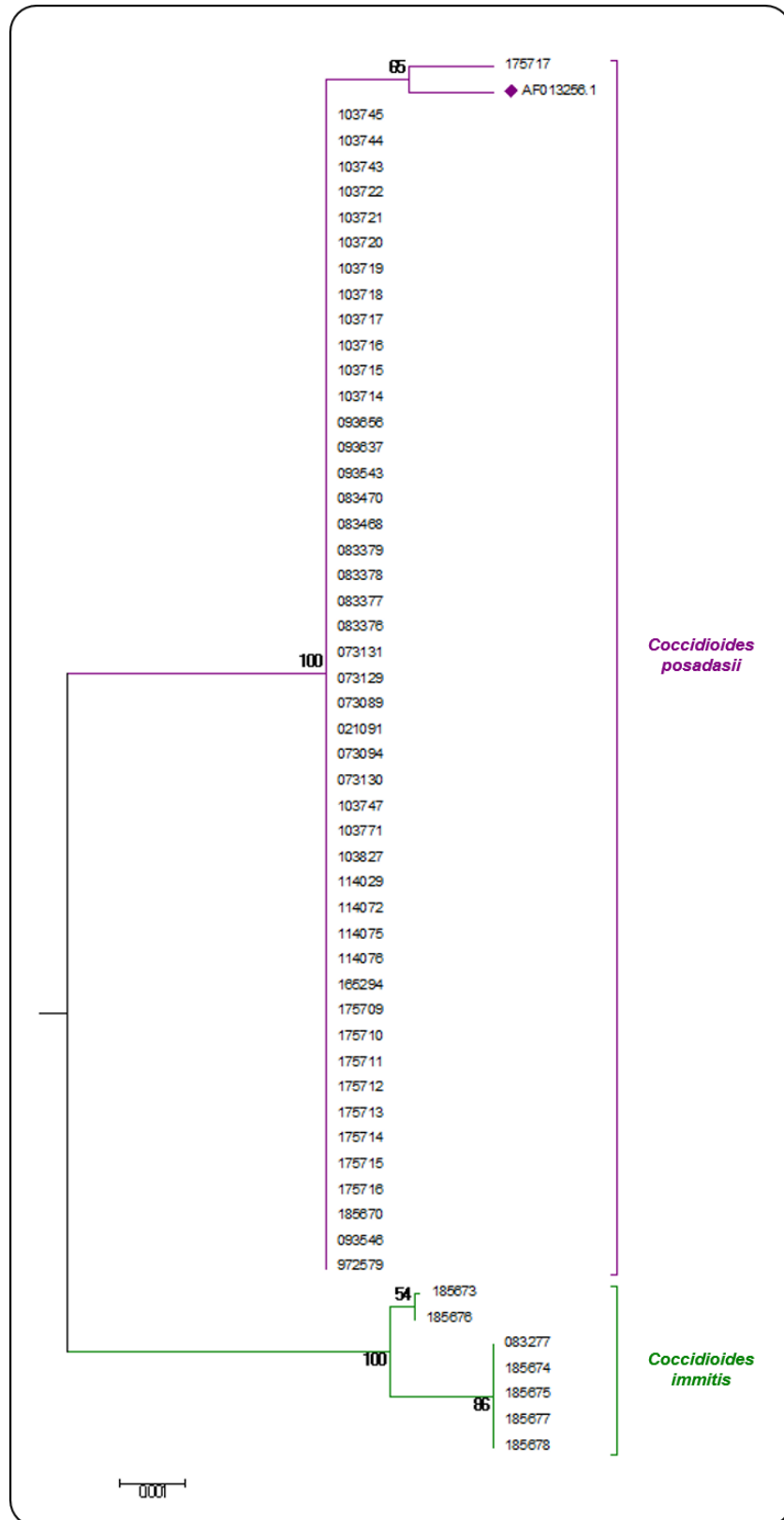


Figura 5.18: Árbol de relaciones evolutivas entre el género (787 nt). Inferido por el método Neighbor-Joining para las regiones Ag2/PRA + ITS1 + ITS2 y generado por el programa MEGA V6.0. Bootstrap: 1000. ♦ Cepa de referencia Silveira.

6- DISCUSIÓN

En este trabajo se re-identificaron y se analizaron las características fenotípicas y genotípicas de 47 cepas clínicas de *Coccidioides* spp. que forman parte de la Colección de Cultivos del Departamento Micología (DMic). Las mismas, provienen de 43 pacientes diagnosticados por laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Micología Clínica de Argentina y representan el total de cepas colectadas y viables depositadas en la colección. Adicionalmente, se analizaron como controles, siete cepas de *C. immitis* de origen mexicano depositadas en la Colección DMic.

La CDM se considera una micosis desatendida a pesar de su impacto sustancial en la salud pública. En los últimos veinte años se ha observado un aumento en la incidencia de la enfermedad e inclusive, se han descripto nuevas áreas endémicas [Canteros et al., 2010; Tsang et al., 2013; Litvintseva et al., 2015; Kirkland, 2016]. Como la mayoría de los países con regiones endémicas de CDM, la enfermedad no es de notificación obligatoria a nivel nacional en la República Argentina, por lo que el número de casos descriptos e informados está subestimado [Baptista-Rosas & Riquelme, 2007b; Martínez-Méndez et al., 2015]. Además, considerando las manifestaciones clínicas y el cuadro de la enfermedad, en muchos casos no se sospecha y por lo tanto tampoco es diagnosticada, ya que puede resolver de manera espontánea y sin dejar secuelas aparentes [Cox & Magee, 2004; Arenas, 2008; Welsh et al., 2012]. La presencia de contaminantes o muestras con flora mixta también dificulta el aislamiento de *Coccidioides*, que por sus características fisiológicas resulta ser “mal competidor” y, en muchos casos, no es posible obtener el cultivo puro, siendo necesario adicionar antibióticos a los medios de cultivo, para inhibir crecimiento bacteriano y cicloheximida para inhibir el desarrollo de otros hongos saprófitos presentes en el material y que además, crecen más rápido que *Coccidioides* [Sutton, 2007]. Todo esto, sumado al nivel de bioseguridad requerido para manejar el microorganismo (BSL3), hace que en muchas ocasiones, las cepas aisladas se descarten por falta de instalaciones para su manejo [Bialek et al., 2004; CDC, 2009; Twarog & Thompson, 2015]. Por lo expuesto, es probable que el número de cepas aquí analizadas solo representen una pequeña porción de las circulantes en nuestra región.

El análisis de los datos asociados a las cepas nos permitió confirmar que casi la mitad de los aislados (47%) provienen de pacientes que residen o trabajan en la provincia de Catamarca lo que confirma estudios previos realizados en nuestro país

[Negroni, 2008; Canteros *et al.*, 2010]. Adicionalmente, el caso veterinario aporta evidencia molecular a las observaciones epidemiológicas realizadas en esta provincia que indican que el número de perros diagnosticados con CDM ha aumentado significativamente en el período 2004-2015 [Red nacional de Laboratorios de Micología]. Considerando que humanos y perros comparten el mismo hábitat, es un dato de relevancia al momento del análisis de las regiones endémicas.

En nuestro estudio se observó que el género más afectado es el masculino de mediana edad (Me = 45 años), asociado principalmente a actividades rurales, de minería y construcción. Esto fue descrito por otros autores y probablemente esté asociado a una mayor probabilidad de exposición al agente [Hector & Laniado-Laborin, 2005; Nguyen *et al.*, 2013; Odio *et al.*, 2017]. Algunos autores comenzaron a observar en la población de Los Ángeles, CA, EE.UU. cambios en la epidemiología, con una disminución importante de la relación hombre/mujer, desde valores históricos entre 2,1 a 5,7 en el período 1992-2003 a valores entre 1,4 a 2,2 en 2004-2011, observando que lo que más influye en el aumento del número de casos de CDM es cualquier actividad perturbadora del suelo [Guevara *et al.*, 2015]. No se conocen las causas de las disparidades raciales asociadas a las infecciones por *Coccidioides* spp.; sin embargo, en países con gran diversidad étnica, la diseminación extrapulmonar de *Coccidioides* spp. se asocia significativamente con población de raza negra [Louie *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2013]. En nuestro estudio, las cepas analizadas fueron aisladas casi equitativamente desde formas clínicas pulmonares y diseminadas (52% y 48%, respectivamente; Figura 5.2). Considerando que, según diversos autores la presentación clínica más frecuente de CDM es la pulmonar [Galgiani *et al.*, 2005; Ampel, 2010; Brown *et al.*, 2013] llama la atención el alto porcentaje de formas diseminadas. En Argentina, la mayoría de los habitantes son de ascendencia hispana o mestizos, aunque no creemos que lo observado está asociado a la raza sino a que, en muchos casos, las formas respiratorias pasan desapercibidas, son ignoradas o solapadas como un cuadro gripal y posteriormente resuelven sin secuelas aparentes, por lo cual no se tiene registro de estos casos (subdiagnosticadas). Por otra parte, los pacientes con formas diseminadas llegan a la consulta por la gravedad del cuadro y/o porque tienen asociadas otras patologías. Reforzando esta hipótesis, en nuestro estudio el 38% de los pacientes con formas diseminadas presentó inmunocompromiso y/o comorbilidades (tabla 5.1). Otra causa de la CDM diseminada y sus formas graves, se asocia a influencias genéticas, como el tipo de grupo sanguíneo ABO y los alelos de antígeno leucocitario humano (HLA) [Louie *et al.* 1999], variables que en nuestro

estudio, no fueron analizadas por ausencia de datos. Como el estudio aquí presentado no registra todos los casos de CDM en Argentina sino los casos con aislamiento positivo, un análisis más profundo con la casuística real y la epidemiología de la micosis en el país se escapa a los objetivos de este trabajo.

Todas las cepas analizadas en el primoaislamiento presentaron características macro y microscópicas compatibles con el género *Coccidioides*. En el subcultivo realizado para nuestro estudio, a partir del día 10, desarrolló un micelio blanco, algodonoso y al examen microscópico, a partir de la cuarta semana, todas las cepas mostraron artroconidios característicos de la especie. Por su parte, la conversión en medio de Converse de fase micelial a esférula, en general demanda más de 20 días y en algunos casos la reversión se torna dificultosa. Previo a los métodos moleculares aplicados a la identificación de especies esta prueba, junto con la producción de exoantígeno específico, era una de las que podían confirmar la identidad de *Coccidioides* spp., ya que el género *Malbranchea* (Orden: *Onygenales*) también presenta artroconidios intercalados con células disyuntoras al examen microscópico, pero no produce esférulas a partir de micelio [Sutton *et al.*, 1998; de Hoog *et al.*, 2000]. Como era de esperar, las esférulas obtenidas *in vitro* fueron de un tamaño mucho menor que el que se observa *in vivo*, 5-20 μm de diámetro *versus* 20-80 μm , respectivamente. Esto coincide con lo observado previamente por otros autores, que determinaron que las esférulas originalmente transformadas a partir de artroconidios y fragmentos de hifas medían generalmente 15 a 35 μm y cuando las esférulas se mantuvieron en el cultivo continuo (sin renovación de medio), se observó una disminución gradual del tamaño, obteniéndose esférulas que medían solo 5 μm [Breslau & Kubota, 1964]. La producción de exoantígeno específico fue positiva en todas las cepas de ambas especies analizadas, lo que demuestra su utilidad para identificar el género. A pesar que la obtención del exoantígeno requiere un cultivo de 40 días de incubación, posterior inactivación y control de viabilidad, se considera un método más simple en comparación con la obtención de esférulas [Kwon-Chung & Bennett, 1992]. Además, debemos recalcar que trabajar con micelio de *Coccidioides* spp. requiere instalaciones de BSL3 y personal altamente calificado, por lo que la identificación, incluso a nivel de género, queda limitada a laboratorios de referencia.

Hasta 2002, se describía a *C. immitis* como el único agente causal de la CDM. Ese año, fueron descritas las dos especies (*C. immitis* y *C. posadasii*) y su distribución filogeográfica [Fisher *et al.*, 2002]. La especie descrita mayoritariamente

en las diferentes áreas endémicas es *C. posadasii*, limitando a la especie *C. immitis* en la región del Valle de San Joaquín, CA, y estados limítrofes de EE.UU., así como de regiones colindantes del norte de México [Fisher *et al.*, 2002; Laniado-Laborin, 2005; Luna-Isaac *et al.*, 2014]. Sin embargo, a medida que se fue ampliando el número de cepas analizadas, se empezaron a registrar casos autóctonos de CDM provocados por *C. immitis* fuera de las áreas geográficas esperadas, como en el estado de Washington, EE.UU., donde la especie también se aisló del suelo [Litvintseva *et al.*, 2015], en Colombia, de un paciente que no visitó otros países [Canteros *et al.*, 2015], en Venezuela [Johnson *et al.*, 2015] e inclusive hay trabajos que hacen referencia a una cepa de un paciente de Argentina sin un dato que permita la trazabilidad del origen citado [Kophopanou *et al.*, 1997; Engelthaler *et al.*, 2016].

Como se ha demostrado, sólo la secuenciación permite identificar inequívocamente las especies. Sin embargo, los laboratorios de diagnóstico en general no acceden a estas técnicas moleculares, por lo que la mayoría de los aislamientos solo se identifican a nivel de género. Umeyama y cols. [2006] describieron una PCR de punto final, donde las especies se identificaban fácilmente en un gel por diferencia de peso molecular de la banda amplificada. Sin embargo, a medida que se analizaban más cepas, la técnica mostró ambigüedades [Tintelnot *et al.*, 2007] por lo que actualmente en la identificación se utiliza la secuenciación del fragmento del gen *Ag2/PRA* y los ITS [Bialek *et al.*, 2004; De Aguiar Cordeiro *et al.*, 2007; Tintelnot *et al.*, 2007; Johnson S *et al.*, 2015]. El uso de la secuenciación es un inconveniente en nuestra región, donde los laboratorios que detectan los casos de CDM no acceden a esta metodología. Si bien la identificación de especies hasta el momento no tiene relevancia clínico/epidemiológica, ya que no se ha podido establecer una relación entre la especie causante, el curso de la enfermedad o la mayor o menor incidencia de la CDM [Luna-Isaac *et al.*, 2014]; son pocos los trabajos de las áreas endémicas de las Américas, donde sistemáticamente las especies son identificadas y caracterizadas genéticamente, como para poder concluir la relación de las especies y/o genotipos con la patogenicidad.

Este es el primer trabajo en Sudamérica donde se identifican 47 cepas de pacientes con CDM, sin antecedentes de viajes a países fuera del cono sur de América, específicamente fuera de Argentina y Bolivia. Si bien, Luna-Isaac y cols. [2014] informaron que no existe una relación significativa entre el genotipo y la presentación clínica, observaron que *C. immitis* tiene mayor tendencia a la

diseminación cutánea. Esto discrepa de lo observado en nuestro estudio, ya que en 11/21 formas diseminadas (incluyendo el caso veterinario), las cepas fueron aisladas de lesiones cutáneas y la especie fue identificada *C. posadasii*.

En base a los resultados de la amplificación de las tres regiones: *Ag2/PRA*, ITS1 e ITS2, las 47 cepas de pacientes de Argentina fueron identificadas como *C. posadasii* y las 7 cepas procedentes de México, como *C. immitis*. Este estudio corrobora informes anteriores de la literatura [Fisher *et al.*, 2002] que indican que la especie circulante en Argentina es *C. posadasii*. A diferencia de otros autores que observaron errores en la identificación utilizando diferentes marcadores moleculares, en nuestro estudio, no fueron observadas ambigüedades con los tres marcadores moleculares utilizados [Tintelnot *et al.*, 2007; Luna-Isaac *et al.*, 2014]. Estos autores refieren que las discrepancias podrían estar asociadas a la existencia de especies híbridas, ya que se ha planteado la posibilidad de reproducción sexual en el género *Coccidioides* [Mandel *et al.*, 2007; Neafsey *et al.*, 2010]. Este hecho, probablemente no esté ocurriendo en nuestro medio donde por el momento solo hemos podido identificar *C. posadasii* con poca variabilidad en los perfiles analizados.

En el fragmento del gen *Ag2/PRA* las 47 cepas de *C. posadasii* no mostraron la delección de 12 bases en la posiciones 997-1008 característica de *C. immitis* coincidiendo con lo descrito anteriormente [Canteros *et al.*, 2009; Luna-Isaac *et al.*, 2014; Canteros *et al.*, 2015]. Además, en la mayoría (46/47) de las cepas de Argentina (*C. posadasii*) se observa una G en lugar de C en la posición 1228 respecto a la cepa de referencia Silveira, cambio que puede o no estar en las cepas de Norte América coincidiendo con lo informado previamente [Peng *et al.*, 1999; Bialek *et al.*, 2004]. La especificidad de la PCR anidada descrita por Bialek para la detección de *Coccidioides* spp., así como la potencialidad de la secuenciación para diferenciar especies, convierte a este marcador en uno de los mejores para diagnosticar CDM e identificar especies.

El uso de la amplificación y secuenciación de las regiones ITS-ADNr (ITS1-5.8S-ITS2) también permite la identificación molecular de otros hongos filamentosos al nivel de especie [Schoch *et al.*, 2012]. En concordancia con lo manifestado por otros autores, en nuestro análisis se presentaron inconvenientes para la amplificación de la región completa tal como se describe para otras especies de Onygenales [White *et al.*, 1990; Tintelnot *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2015]. Sólo fue posible la secuenciación de toda la región en 14/54 cepas (datos no mostrados), independientemente de la

especie. Este inconveniente fue resuelto amplificando y secuenciando las regiones ITS1 e ITS2 por separado.

En nuestro análisis, al igual que otros autores, observamos que la región con mayor variabilidad intra-especie fue la ITS2, particularmente en el caso de las cepas de *C. immitis*, esto fue observado tanto en las secuencias realizadas en este trabajo como en aquellas que se importaron del GenBank para enriquecer el análisis [Tintelnot *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2015].

Como en las cepas argentinas de nuestro estudio solamente identificamos *C. posadasii* y una de ellas, aislada en 2017 (DMic 175717) mostró algún tipo de polimorfismo genético, no podemos establecer ninguna relación respecto a una asociación entre especie/genotipo y forma clínica de la enfermedad. Este hallazgo nos plantea la necesidad de contar con más aislamientos regionales para determinar si este genotipo, recientemente aislado, es foráneo o está circulando en nuestro medio con menos frecuencia. Un hecho a resaltar es que en este estudio se revela por primera vez la baja variabilidad intra-especie en los fragmentos de genoma analizados entre las cepas de pacientes de Argentina.

Para confirmar el origen geográfico de las cepas, sería necesario analizar aislados de suelo y/o animales ya que los datos de migración humana no son siempre exactos. No obstante, nuestros resultados nos permiten afirmar que, por el momento, sólo *C. posadasii* circula en la Argentina y las cepas de esta especie analizadas muestran poca o nula variabilidad entre ellas (solo una cepa DMic 175717 agrupa con la cepa tipo Silveira), incluso considerando que una cepa fue aislada de un perro de Catamarca; por lo que podemos considerar que en nuestro país existe un genotipo predominante circulando en toda la región.

Como se expuso previamente, para estudiar más cepas, nos proponemos concientizar a los diferentes laboratorios de las regiones consideradas endémicas o aquellas que por sus características geográficas pudieran serlo, sobre la necesidad de informar la sospecha de un caso para poder contar con mayores datos epidemiológicos y articular los mecanismos para remitir de forma segura los materiales clínicos y/o cepas del hongo. Además, como la fuente de infección es el suelo, los estudios ecológicos con aislados ambientales y mapas geológicos sobre el tipo de suelo pueden aportar datos para la planificación al momento que se propongan alteraciones del mismo en áreas endémicas o áreas cercanas que no son endémicas

para *Coccidioides* spp. [Welsh *et al.*, 2012]. Esta planificación debe realizarse cuando hay remoción de suelos y debe involucrar el desarrollo y la ejecución de estrategias de educación y prevención para minimizar la exposición de los residentes y visitantes a estas áreas endémicas.

En resumen, cualquiera de las regiones genómicas analizadas en este trabajo es útil para la identificación molecular de las especies de *Coccidioides* sin ambigüedad y las secuencias concatenadas de las regiones *Ag2/PRA*, ITS1 e ITS2 son más informativas para conocer la genética de poblaciones que solo una secuencia. Solo una cepa *C. posadasii* se separa del resto de las cepas de Argentina y agrupa con la cepa Silveira con un bootstrap de 65 (Figura 5.18).

Para concluir esta discusión, voy a citar el título de una revisión reciente: “La búsqueda de una vacuna contra la Coccidioidomicosis: Una enfermedad desatendida de las Américas” [Kirkland, 2016]. Permitiéndome además, hacer foco en la realidad y en la necesidad de maximizar nuestros esfuerzos a nivel diagnóstico, epidemiológico y de investigación en un “hongo inusual que es capaz de provocar una enfermedad invasiva, incluso en hospederos sanos”.

7- CONCLUSIONES

Los métodos microbiológicos clásicos no revelaron diferencias entre las cepas de *Coccidioides* spp. analizadas. Los 47 aislamientos de pacientes de Argentina mostraron artroconidios característicos, conversión dimórfica en medios especiales y producción de exoantígeno compatibles con el género *Coccidioides*.

Las 47 cepas de pacientes de Argentina fueron identificadas sin ambigüedades como *C. posadasii* por la secuenciación de las regiones *Ag2/PRA*, ITS1 e ITS2.

El análisis de los datos asociados a las cepas nos permitió confirmar que el área geográfica de mayor endemicidad de la coccidiodomicosis en Argentina es la provincia de Catamarca, ya que casi la mitad (47%) de las cepas analizadas provenían de pacientes que residían o trabajaban en esa provincia.

No se observó predominio de alguna forma clínica en los pacientes de donde se aislaron las cepas: 52% forma clínica pulmonar y 48% formas diseminadas, siendo predominante la diseminación cutánea. Además el 38% de los pacientes con formas diseminadas presentó inmunocompromiso y/o comorbilidad.

Este es el primer trabajo realizado en Sudamérica donde se identifican más de 40 cepas de pacientes con CDM, sin antecedentes de viajes a países fuera del cono sur de América, más específicamente fuera de Argentina y Bolivia.

Se confirmó la baja variabilidad intra-especie del gen *Ag2/PRA* y de los fragmentos ITS en un importante número de las cepas aisladas de pacientes de Argentina. Además, el análisis de las tres regiones en conjunto (*Ag2/PRA*, ITS1 e ITS2) confirmó y fortaleció el análisis.

La región con mayor variabilidad intra-especie fue la ITS2, particularmente en el caso de las cepas de *C. immitis*.

Es probable que el número de cepas de Argentina aquí analizadas solo representen una pequeña porción de las circulantes en nuestra región, sin embargo, nos permite concluir que las cepas circulantes en nuestro país hasta la fecha son *C. posadasii*.

Para robustecer estas conclusiones, es necesario vigilar las especies y genotipos de *Coccidioides* spp. aislados de pacientes de Argentina para aportar al conocimiento de la epidemiología de la CDM en las Américas.

8- PERSPECTIVAS A CORTO PLAZO

Robustecer la Colección de Cultivos Microbianos del Departamento Micología mantenida en el BSL3 de la UOCCB incluyendo en la base de datos las características genotípicas de las cepas analizadas.

Identificar molecularmente y caracterizar cada una de las cepas de *Coccidioides* spp. que ingresen a la Colección DMic.

9- ANEXO

Medios de cultivo, soluciones y materiales

ASG-2%: Agar Sabouraud glucosa 2%

Peptona 1%, glucosa 2%, agar 1,5% en H₂O destilada, pH: 5,6 +/- 0,3. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C y 1 atm. de presión. Se fraccionó para su uso en frascos de cultivos T-25 con tapa a rosca y tubos de 150 x 10 mm con tapa a rosca. Se usaron 8 ml por frasco de cultivo y 10 ml por tubo formando pico de flauta. Control de calidad: (a) de esterilidad incubando todo el lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) de crecimiento incubando 2 tubos / frascos por lote con *Candida albicans* (ATCC 60193) y otro con *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) hasta observar crecimiento.

AS-CC: Agar Sabouraud Cicloheximida Cloranfenicol

Peptona 1%, glucosa 2%, agar 1,5%, cloranfenicol 0,0025%, cicloheximida 0,004% en H₂O destilada, pH: 6,9 +/- 0,3. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C y 1 atm. de presión. Se fraccionó para su uso en tubos de 150 x 10 mm con tapa a rosca. Se usaron 10 ml por tubo formando pico de flauta. Control de calidad: (a) de esterilidad incubando todo el lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) de crecimiento incubando 2 tubos/frascos por lote con *Candida albicans* (ATCC 60193) y otro con *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) hasta observar crecimiento.

GYE: Agar glucosa extracto de levadura

Glucosa 2%, extracto de levadura 1%, agar 1,5% en H₂O destilada, pH: 5,6 +/- 0,3. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C y 1 atm. de presión. Se fraccionó para su uso en tubos de 150 x 10 mm con tapa a rosca. Se usaron 10 ml por tubo formando pico de flauta. Control de calidad: (a) de esterilidad incubando todo el lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) de crecimiento incubando 2 tubos por lote con *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019) hasta observar crecimiento.

YE: Caldo extracto de levadura 3%

Extracto de levadura 3%, en H₂O destilada. Se fraccionaron 175 ml en Erlenmeyer de polimetilpenteno (PMP) de 250 ml y se esterilizaron en autoclave

durante 15 min a 120 °C y 1 atm. de presión. Control de calidad: (a) de esterilidad incubando todo el lote durante 48 h a 25-28 °C.

Medio líquido de Converse

Se prepararon cada una de las soluciones y se mantuvieron en heladera por un intervalo máximo de seis meses para su uso. Para la preparación del medio se utilizaron las siguientes proporciones: 22 ml de glucosa 1M, 16 ml de acetato de amonio 1M, 3,75 ml de fosfato monopotásico 1M, 3 ml de fosfato dipotásico 1M, 1,6 ml de sulfato de magnesio 1M, 1,24 ml de sulfato de zinc 0.01M, 24 ml cloruro de sodio 0.01M, 14 ml de bicarbonato de sodio 0.01 M, 2ml de cloruro de calcio 0.01 M en H₂O destilada csp 1000 ml. pH: 6,0. Se esterilizó en autoclave durante 10 min a 120 °C y 1 atm. de presión. Se fraccionó para su uso en tubos de 150 x 20 mm con tapa a rosca. Se usaron 20 ml por tubo. Control de calidad: (a) de esterilidad incubando todo el lote durante 48 h a 35-37 °C.

CTS: Caldo tripticasa de soya (CTS)

Tripticasa de soya 5%, extracto de levadura 1%, glucosa 1% en H₂O destilada. Se fraccionaron 200 ml en Erlenmeyer de PMP de 500 ml y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 120 °C y 1 atm. de presión. Control de calidad: (a) de esterilidad incubando todo el lote durante 48 h a 25-28 °C y (b) de crecimiento incubando un frasco del lote con *Escherichia coli* (ATCC 25922) hasta observar crecimiento.

Agar fenolizado 1%

Cloruro de sodio 0,9%, citrato de sodio 0,5%, fenol 3‰ 0,25 ml, glicina 7,5%, agar purificado 1% y H₂O destilada csp100 ml. pH: 6,3-6,4. Se calentó en baño de agua a 100 °C hasta fundir el agar. Se fraccionó en tubos estériles con tapa a rosca y se mantuvieron en heladera hasta el momento de su utilización para preparar los portaobjetos.

Solución colorante

Azul de Comassie R-250 0,03%, metanol 50%, ácido acético 20% y H₂O destilada csp100 ml.

Solución decolorante

Metanol 50%, ácido acético 20% en H₂O destilada.

Solución de Gel Red

40 µl de Gel red (Biotium® California, EE.UU.) en 400 ml de solución acuosa de ClNa 0,1 M. Mantener en contenedor al resguardo de la luz.

Solución de Lactofenol Azul de Algodón (LF-AA)

Fenol 10 g, ácido láctico 10 ml, glicerina 20 ml, 1 ml de solución acuosa filtrada de Azul de algodón 1% y H₂O destilada 10 ml. Fraccionar en frascos gotero.

10- BIBLIOGRAFÍA

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-10
2. Ampel, N. M. (2009). The diagnosis of coccidioidomycosis. *F1000 Medicine Reports*. 4: 8-11.
3. Arenas, R. (2008). *Micología Médica Ilustrada*. McGraw-Hill Interamericana, 3era edición. Capítulo 16: Coccidioidomycosis.
4. Baptista-Rosas, R. C., Hinojosa, A., & Riquelme, M. (2007a). Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North American deserts. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111: 35-46.
5. Baptista Rosas, R. C., & Riquelme, M. (2007b). Epidemiología de la coccidioidomycosis en México. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24(2): 100-105.
6. Belou, P. (1908). *Tratado de Parasitología Animal*. Parte I. La Ciencia Médica, Buenos Aires.
7. Bialek, R., Kern, J., Herrmann, T., Tijerina, R., Ceceñas, L., Reischl, U., & González, G. M. (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(2): 778-783.
8. Binnicker, M. J., Buckwalter, S. P., Eisberner, J. J., Stewart, R. A., McCullough, A. E., Wohlfiel, S. L., & Wengenack, N. L. (2007). Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(1): 173-178.
9. Breslau, A. M., & Kubota, M. Y. (1964). Continuous *in vitro* cultivation of spherules of *Coccidioides immitis*. *Journal of Bacteriology*. 87(2): 468-472.
10. Brillhante, R. S. N., De Lima, R. A. C., Ribeiro, J. F., De Camargo, Z. P., Castelo-Branco, D. D. S. C. M., Grangeiro, T. B., Sidrim, J. J. C. (2013). Genetic diversity of *Coccidioides posadasii* from Brazil. *Medical Mycology*. 51(4): 432-437.
11. Brown, J., Benedict, K., Park, B. J., & Thompson, G. R. (2013). Coccidioidomycosis: Epidemiology. *Clinical Epidemiology*. 5(1): 185-197.
12. Burt, A., Dechairo, B. M., Koenig, G. L., Carter, D. A., White, T. J., & Taylor, J. W. (1997). Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Molecular Ecology*. 6(8): 781-786.
13. Canteros, C. E., Toranzo, A., Suarez-Alvarez, R., Davel, G., Castanon-Olivares, L. R., & Napoli, J. (2009). Identidad genética del hongo causante del primer caso de

- coccidioidomycosis descrito por Alejandro Posadas en 1892. *Medicina (Buenos Aires)*. 69(2): 215-220.
14. Canteros, C. E., Toranzo, A., Ibarra-Camou, B., David, V., Carrizo, S. G., Santillán-Iturres, A., Davel, G. (2010). La coccidioidomycosis en Argentina, 1892-2009. *Revista Argentina de Microbiología*. 42(4): 261-268.
 15. Canteros, C. E., Vélez H., A., Toranzo, A. I., Suárez-Alvarez, R., Tobón O. A., Del Pilar Jimenez A. M., & Restrepo M. A. (2015). Molecular identification of *Coccidioides immitis* in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from a Colombian patient. *Medical Mycology*. 53(5): 520-527.
 16. Carrada-Bravo, T. (2014). Los métodos de laboratorio en el diagnóstico de la coccidioidomycosis. *Revista Chilena de Infectología*. 31(3): 293-297.
 17. Castro A., & Trejos A. (1953). Primer caso centroamericano de coccidioidomycosis. *Revista de Biología Tropical*. 1(1): 83-93.
 18. Centers for Disease Control and Prevention. (2008). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th edition.
 19. Churgin, S. M., Garner, M. M., Swenson, J., Bradway, D. S., French, S., Kiupel, M., & West, G. (2013). Intestinal coccidioidomycosis in a red coachwhip snake (*Masticophis flagellum piceus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 44(4): 1094-1097.
 20. Comrie, A. C. (2005). Climate factors influencing Coccidioidomycosis, seasonality and outbreaks. *Environmental Health Perspectives*. 113(6): 688-692.
 21. Converse, J. L. (1955). Growth of spherules of *Coccidioides immitis* in a chemical defined liquid medium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 90: 709-711.
 22. Converse, J. L. (1956). Effect of physico-chemical environment of spherulation of *Coccidioides immitis* in a chemical defined medium. *Journal of Bacteriology*. 72: 784-792.
 23. Converse, J. L., & Besemer, A. R. (1959). Nutrition of the parasitic phase of *Coccidioides Immitis* in a chemically defined liquid medium. *Journal of Bacteriology*. 78: 231-239.
 24. Cooke J. V. (1915). Immunity tests in coccidioidal granuloma. *Archives of Internal Medicine (Chic)*. XV(3): 479-486.
 25. Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S., & Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(4): 411-428.

26. Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S. N., Rocha, M. F. G., Fachine, M. A. B., Camara, L. M. C., Camargo, Z. P., & Sidrim, J. J. C. (2006). Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. *Medical Mycology*. 44(7): 631-639.
27. Cox, R. A., & Magee, D. M. (2004). Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(4): 804-839.
28. Cummings, K. C., Mcdowell, A., Wheeler, C., McNary, J., Das, R., Vugia, D. J., & Mohle-Boetani, J. C. (2010). Point-source outbreak of coccidioidomycosis in construction workers. *Epidemiology and Infection*. 138(4): 507-511.
29. de Aguiar Cordeiro, R., Nogueira Brilhante, R. S., Gadelha Rocha, M. F., Araújo Moura, F. E., Pires De Camargo, Z., & Costa Sidrim, J. J. (2007). Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. *Clinical Microbiology and Infection*. 13(4): 449-451.
30. de Hoog G. S., Guarro J., Gene J., & Figueras M. J. (2000). Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 2nd ed, vol. 1.
31. De Macêdo, R. C. L., Rosado, A. S., Da Mota, F. F., Cavalcante, M. A. S., Eulálio, K. D., Filho, A. D., & Wanke, B. (2011). Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiology*. 11(1): 108.
32. DiCaudo, D. J. (2006). Coccidioidomycosis: A review and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 55(6): 929-942.
33. Dickson, E. C. (1937). "Valley Fever" of the San Joaquin Valley and fungus *Coccidioides*. *California and Western Medicine*. 47(3): 151-155.
34. Dickson, E. C., & Gifford, M. A. (1938). *Coccidioides* Infection (Coccidioidomycosis) II. The primary type of infection. *Archives of Internal Medicine (Chic)*. 62(5): 853-871.
35. Duarte-Escalante, E., Frías-De-León, M. G., Zúñiga, G., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Reyes-Montes, M. del R. (2014). Molecular markers in the epidemiology and diagnosis of coccidioidomycosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 31(1): 49-53.
36. Egeberg, R. O., Elconin, A. E., & Egeberg, M. C. (1964). Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *Journal of Bacteriology*. 88(2): 473-476.
37. Elconin, A. F., Egeberg, R. O., & Egeberg, M. C. (1964). Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *Journal of Bacteriology*. 87(3): 500-503.

38. Emmons, C. W. (1942). Isolation of *Coccidioides* from soil and rodents. *Public Health Reports*. 57: 109-111.
39. Engelthaler, D. M., Roe, C. C., Hepp, C. M., Teixeira, M., Driebe, E. M., Schupp, J. M., Litvintseva, A. P., *et al.* (2016). Local population structure and patterns of western hemisphere dispersal for *Coccidioides* spp., the fungal cause of Valley Fever. *MBio*. 7(2): 1-15.
40. Fisher, F. S., Bultman, M. W., Johnson, S. M., Pappagianis, D., & Zaborsky, E. (2007). *Coccidioides* niches and habitat parameters in the southwestern United States: A matter of scale. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111: 47-72.
41. Fisher, M. C., Koenig, G. L., & White, T. J. (1999). Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular Ecology*. 8: 1082-1084.
42. Fisher, M. C., Koenig, G. L., White, T. J., & Taylor, J. W. (2002). Molecular and phenotypic description of *Coccidioides pasadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California populations of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 94(1): 73-84.
43. Gago, S., Buitrago, M. J., Clemons, K. V., Cuenca-Estrella, M., Mirels, L. F., & Stevens, D. A. (2014). Development and validation of a quantitative real-time PCR assay for the early diagnosis of coccidioidomycosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 79(2): 214-221.
44. Galgiani, J. N. (1993). Coccidioidomycosis. *The Western Journal of Medicine*. 159(2): 153-171.
45. Galgiani, J. N., Ampel, N. M., Blair, J. E., Catanzaro, A., Johnson, R. H., Stevens, D. A., & Williams, P. L. (2005). Coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 41: 1217-1223.
46. Giacomazzi, J., Baethgen, L., Carneiro, L. C., Millington, M. A., Denning, D. W., Colombo, A. L., & Pasqualotto, A. C. (2016). The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 59(3): 145-150.
47. Graupmann-Kuzma, A., Valentine, B. A, Shubitz, L. F., Dial, S. M., Watrous, B., & Tornquist, S. J. (2008). Coccidioidomycosis in dogs and cats: a review. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 44(5): 226-235.
48. Guevara, R. E., Motala, T., & Terashita, D. (2015). The changing epidemiology of coccidioidomycosis in Los Angeles (LA) County, California, 1973-2011. *PLoS ONE*. 10(8): 1-16.

49. Hagman, H. M., Madnick, E. G., D'Agostino, A. N., Williams, P. L., Shatsky, S., Mirels, L. F., Bryant, R. E., *et al.* (2000). Hyphal forms in the central nervous system of patients with coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 30(2): 349-353.
50. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
51. Hector, R. F., & Laniado-Laborin, R. (2005). Coccidioidomycosis- A fungal disease of the Americas. *PLoS Medicine*. 2(1): 0015–0018.
52. Hirsch, E. F., & Benson, H. (1927). Specific skin and testis reactions with culture filtrates of *Coccidioides immitis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 40: 629-633.
53. Hirschmann, J. V. (2007). The Early History of Coccidioidomycosis: 1892-1945. *Clinical Infectious Diseases*. 44(9): 1202-1207.
54. Iglesias Casal, J., Suárez Alvarez, R. O., Lee, W., Rivas, M. C., Davel, G., & Canteros, C. E. (2008). Coccidioidomycosis diseminada en un canino. *Revista Argentina de Microbiología*. 40(2): 109-109.
55. Johannesson, H., Vidal, P., Guarro, J., Herr, R. A., Cole, G. T., & Taylor, J. W. (2004). Positive directional selection in the proline-rich antigen (PRA) gene among the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* and their closest relatives. *Molecular Biology and Evolution*. 21(6): 1134-1145.
56. Johnson, R. H., & Einstein, H. E. (2006). Coccidioidal meningitis. *Clinical Infectious Diseases*. 42(1): 103-107.
57. Johnson, S. M., Simmons, K. A., & Pappagianis, D. (2004). Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(5): 1982-1985.
58. Johnson, S. M., Carlson, E. L., & Pappagianis, D. (2015). *Coccidioides* species determination: Does sequence analysis agree with Restriction Fragment Length Polymorphism? *Mycopathologia*. 179(5–6): 373-379.
59. Kirkland, T. N. (2016). The Quest for a vaccine against Coccidioidomycosis: A neglected disease of the Americas. *Journal of Fungi*. 2(34): 1-10
60. Kolivras, K. N., & Comrie, A. C. (2003). Modeling valley fever (coccidioidomycosis) incidence on the basis of climate conditions. *International Journal of Biometeorology*, 47(2): 87-101.
61. Koufopanou, V., Burt, A., & Taylor, J. W. (1997). Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(10): 5478-5482.
62. Kwon-Chung KJ & Bennett JE. (1992). *Medical Mycology*. Lea & Febiger eds. Capítulo 15: Coccidioidomycosis. 356-396.
 63. Lacy, G. H., & Swatek, F. E. (1974). Soil ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian middens in California. *Applied Microbiology*. 27(2): 379-388.
 64. Lewis, E. R. G., Bowers, J. R., & Barker, B. M. (2015). Dust Devil: The life and times of the fungus that causes Valley Fever. *PLoS Pathogens*. 11(5): 1-7.
 65. Litvintseva, A. P., Marsden-Haug, N., Hurst, S., Hill, H., Gade, L., Driebe, E. M., Chiller, T., *et al.* (2015). Valley fever: Finding new places for an old disease: *Coccidioides immitis* found in Washington state soil associated with recent human infection. *Clinical Infectious Diseases*. 60(1): e1-e3.
 66. Louie, L., Ng, S., Hajjeh, R., Johnson, R., Vugia, D., Werner, S. B., Klitz, W., *et al.* (1999). Influence of host genetics on the severity of coccidioidomycosis. *Emerging Infectious Diseases*. 5(5): 672-680.
 67. Lubarsky, R., & Plunkett O. (1954). Survival of *C. immitis* In passage through the digestive tract of mice. *Public Health Reports*. 69(5): 494-497.
 68. Luna-Isaac, J. A., Muñoz-Salazar, R., Baptista-Rosas, R. C., Enríquez-Paredes, L. M., Castañón-Olivares, L. R., Contreras-Pérez, C., González-Martínez, M. R., *et al.* (2015). Genetic analysis of the endemic fungal pathogens *Coccidioides posadasii* and *Coccidioides immitis* in México. *Medical Mycology*. 52(2): 156-166.
 69. Mandel, M. A., Barker, B. M., Kroken, S., Rounsley, S. D., & Orbach, M. J. (2007). Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition. *Eukaryotic Cell*. 6(7): 1189-1199.
 70. Manzanares, J. (2017). Manifestaciones de salud asociadas a elementos medio ambientales: el caso de la ocurrencia de coccidioidomicosis en México 2004-2015. *Población y Salud en Mesoamérica*. 15(2).
 71. Martínez Méndez, D., Hernández Valles, R., Alvarado, P., & Mendoza, M. (2013). Las micosis en Venezuela: Casuística de los Grupos de Trabajo en Micología (1984-2010). *Revista Iberoamericana de Micología*. 30(1): 39-46.
 72. Martínez-Méndez, D., Semprún-Hernández, N., Hernández-Valles, R. (2015). Coccidioidomicosis: Estado actual de la endemia en Venezuela. *Investigación Clínica*. 56(4): 411-420.

73. Muñoz, B., Castañón, L. R., Calderón, I., Vázquez, M. E., & Manjarrez, M. E. (2004). Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in mexican patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(3): 1247-1249.
74. Muñoz-Hernández, B., Palma-Cortés, G., Cabello-Gutiérrez, C., & Martínez-Rivera, M. A. (2014). Parasitic polymorphism of *Coccidioides* spp. *BMC Infectious Diseases*. 14:213 1-9.
75. Neafsey, D. E., Barker, B. M., Sharpton, T. J., Stajich, J. E., Park, D. J., Whiston, E., Rounsley, S. D., *et al.* (2010). Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Research*. 20(7): 938-946.
76. Negroni, P., Daglio, C. A. N., & Briz de Negroni, C. (1949). Estudios sobre el *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist. (V) Primera investigación sobre la existencia de una epidemia de Coccidioidomycosis en la Argentina. *Revista del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán"*. 14: 55-75.
77. Negroni, R. (2008). Evolución de los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la Coccidioidomycosis en las Américas. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 246-56.
78. Nguyen, C., Barker, B. M., Hoover, S., Nix, D. E., Ampel, N. M., Frelinger, J. A., Galgiani, J. N., *et al.* (2013). Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of Coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(3): 505-525.
79. Odio, C. D., Marciano, B. E., Galgiani, J. N., & Holland, S. M. (2017). Risk factors for disseminated coccidioidomycosis, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 23(2): 308-311.
80. Ophüls, W., & Moffitt, H. C. (1900). A new pathogenic mould (formerly described as a protozoon: *Coccidioides immitis pyogenes*). *Philadelphia Medical Journal*. 5: 1471-2.
81. Ophüls, W. (1905a). Further observations on a pathogenic mould formerly described as a protozoon (*Coccidioides immitis*, *Coccidioides pyogenes*). *Journal of Experimental Medicine*. 6(4-6): 443-485.
82. Ophüls, W. (1905b). Coccidioidal Granuloma. *Journal of the American Medical Association*. XLV(18): 1291-1296.
83. Parish, J. M., & Blair, J. E. (2008). Coccidioidomycosis. *Mayo Clinic Proceedings*. 83(3): 343-349.

84. Peng, T., Orsborn, K. I., Orbach, M. J., & Galgiani, J. N. (1999). Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *The Journal of Infectious Diseases*. 179(2): 518-521.
85. Petersen, L. R., Marshall, S. L., Barton-Dickson, C., Hajjeh, R. A., Lindsley, M. D., Warnock, D. W., Morgan, J., *et al.* (2004). Coccidioidomycosis among workers at an archeological site, northeastern Utah. *Emerging Infectious Diseases*. 10(4): 637-642.
86. Posadas, A. (1892). Un Nuevo caso de micosis fungoide con psorospermias. *Círculo Médico Argentino*. 52: 1-11.
87. Reyes-Montes, M. del R., Pérez-Huitrón, M. A., Ocaña-Monroy, J. L., Frías de León, M. G., Martínez-Herrera, E., Arenas, R., & Duarte-Escalante, E. (2016). The habitat of *Coccidioides* spp. and the role of animals as reservoirs and disseminators in nature. *BMC Infectious Diseases*. 16(1): 1-8.
88. Saubolle, M. A., McKellar, P. P., & Sussland, D. (2007). Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(1): 26-30.
89. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Schindel, D., *et al.* (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(16): 6241-6246.
90. Smith, C. E. (1940). Epidemiology of Acute Coccidioidomycosis with Erythema Nodosum ("San Joaquin" or "Valley Fever"). *American Journal of Public Health and the Nations Health*. 30(6): 600-611.
91. Smith, C. E., & Beard, R. R. (1946). Varieties of coccidioid infection in relation to the epidemiology and control of the diseases. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*. 36(12): 1394-1402.
92. Stevens, D. A., Clemons, K. V., Levine, H. B., Pappagianis, D., Baron, E. J., Hamilton, J. R., Johnson, N., *et al.* (2009). Expert Opinion: What to do when there is *Coccidioides* exposure in a laboratory? *Clinical Infectious Diseases*. 49(6): 919-923.
93. Stewart, R. A., Meyer, K. F. (1932). Isolation of *Coccidioides immitis* (Stiles) from the soil. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 29: 937-938.

94. Stockamp, N. W., & Thompson, G. R. (2016). Coccidioidomycosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30(1): 229-246.
95. Sutton, D. A., Fothergill, A. W., & Rinaldi, M. G. (ed.). (1998). Guide to Clinically Significant Fungi, Williams & Wilkins, Baltimore, 1st ed.
96. Sutton, D. A. (2007). Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: Safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111: 315-325.
97. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30(12): 2725-2729.
98. Tintelnot, K., De Hoog, G. S., Antweiler, E., Losert, H., Seibold, M., Brandt, M. A., Fisher, M. C., et al. (2007). Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Medical Mycology*. 45(5): 385-393.
99. Twarog, M., & Thompson, G. R. (2015). Coccidioidomycosis: Recent Updates. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36(5): 746-755.
100. Tsang, C. A, Tabnak, F., Vugia, D. J., et al. (2013). Increase in Reported Coccidioidomycosis -United States, 1998-2011. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 62(12): 217-221.
101. Umeyama, T., Sano, A., Kamei, K., Niimi, M, Nishimura, K. (2006). Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(5): 1859-1862.
102. Viriyakosol, S., Singhanian, A., Fierer, J., Goldberg, J., Kirkland, T. N., & Woelk, C. H. (2013). Gene expression in human fungal pathogen *Coccidioides immitis* changes as arthroconidia differentiate into spherules and mature. *BMC Microbiology*. 13:121
103. Vucicevic, D., Blair, J. E., Binnicker, M. J., McCullough, A. E., Kusne, S., Vikram, H. R., Wengenack, N. L., et al. (2010). The utility of *Coccidioides* polymerase chain reaction testing in the clinical setting. *Mycopathologia*. 170(5): 345-351.
104. Wack, E. E., Ampel, N. M., Sunenshine, R. H., & Galgiani, J. N. (2015). The return of delayed-type hypersensitivity skin testing for coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 61(5): 787-791.
105. Wanke, B., Dos Santos Lazera, M., Monteiro, P. C. F., Lima, F. C., Leal, M. J. S., Ferreira Filho, P. L., Ajello, L., et al. (1999). Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's Northeastern State of Piauí with a review of the

- occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia*. 148(2): 57-67.
106. Welsh, O., Vera-Cabrera, L., Rendon, A., Gonzalez, G., & Bonifaz, A. (2012). Coccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*. 30(6): 573–591.
 107. Werner, S. B., & Pappagianis, D. (1973). Coccidioidomycosis in Northern California. An outbreak among archeology students near Red Bluff. *California Medicine*. 119(3): 16-20.
 108. Whiston E, Zhang Wise H, Sharpton TJ, Jui G, Cole GT, et al. (2012) Comparative Transcriptomics of the Saprobic and Parasitic Growth Phases in *Coccidioides* spp. *PLoS ONE*. 7(7): e41034.
 109. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, CA: Academic Press. 315-322.
 110. Zimmermann, C. R., Snedker, C. J., Pappagianis, D. (1994). Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 32(12): 3040-3042.