



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTRUCTURA DE POBLACIONES DE AISLADOS DE *Coccidioides* spp.
PROCEDENTES DE MÉXICO Y ARGENTINA Y OBTENCIÓN DE MARCADORES
SCARs PARA SU IDENTIFICACIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN EZQUERRO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA

MÉXICO, D.F. MARZO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTRUCTURA DE POBLACIONES DE AISLADOS DE *Coccidioides* spp.
PROCEDENTES DE MÉXICO Y ARGENTINA Y OBTENCIÓN DE MARCADORES
SCARs PARA SU IDENTIFICACIÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN EZQUERRO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA

MÉXICO, D.F. MARZO, 2014.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de enero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **DUARTE ESCALANTE ESPERANZA** con número de cuenta **80212856** con la tesis titulada **"ESTRUCTURA DE POBLACIONES DE AISLADOS DE *Coccidioides* spp. PROCEDENTES DE MÉXICO Y ARGENTINA Y OBTENCIÓN DE MARCADORES SCARs PARA SU IDENTIFICACIÓN"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DEL ROCÍO REYES MONTES**:

Presidente: DR. JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
Vocal: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
Secretario: DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN EZQUERRO
Suplente: DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Suplente: DRA. MARÍA LUCIA TAYLOR DA CUNHA E MELLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de marzo de 2014

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad para alcanzar esta meta

A PAPIIT, por el apoyo financiero para el desarrollo del proyecto “Obtención de Marcadores SCARs a Partir de Patrones AFLP, para la Identificación de Aislados de *Coccidioides* spp. Procedentes de México y Argentina”, Clave: IN-215509

A los miembros del comité tutorial: Dra. Ma. del Carmen Auxilio González Villaseñor y Dra. Ma. del Carmen Calderón Ezquerro, por su tiempo, dedicación y aportaciones durante el desarrollo del trabajo

Agradecimientos a título personal

A mi tutora principal la Dra. María del Rocío Reyes Montes, por haberme impulsado para lograr esta meta en mi carrera, por todos sus consejos y apoyo para la realización del trabajo, pero sobre todo por su invaluable amistad, muchísimas gracias.

A la Dra. Cristina Canteros, con profundo agradecimiento por sus valiosos consejos, y por ser mi amiga, muchas gracias.

A la Dra. María Guadalupe Frías De León, por su gran apoyo en la obtención de los marcadores SCAR, por compartir su conocimiento y tiempo y por ser mi amiga, gracias.

Al Dr. Gerardo Zúñiga, por sus aportaciones y su colaboración en los análisis de la variabilidad genética y estructura de poblaciones, y por su amistad, gracias.

A la Actuaría María Dolores Hernández, por su apoyo en los análisis estadísticos de la caracterización fenotípica de este trabajo, gracias.

A los miembros del jurado,
Dr. Joaquín Cifuentes Blanco
Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro
Dra. Francisca Hernández Hernández
Dra. María Lucía Taylor
por su tiempo y dedicación para la revisión y corrección de la tesis, muchas gracias.

Dedicatorias

A Teo

Porque te quiero y eres una persona muy especial en mi vida, porque hemos compartido momentos de tristeza y alegría y siempre tiene las palabras exactas para alentarme, reconfortarme o provocarme una sonrisa, y porque este logro también es tuyo, gracias por ser como eres.

A mi madre

Porque siempre estás ahí, apoyándome y brindándome cariño y porque me enseñaste lo necesario para salir adelante.

A mi padre, qepd

Porque gracias a tus enseñanzas y ejemplo de vida, he llegado a donde estoy, y aunque sigo extrañándote, siempre estarás conmigo.

A mis hermanos y sobrinos

Porque a pesar de todo, somos una familia, nos queremos y apoyamos, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Hongos	21
Obtención de cultivos monospóricos	22
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	23
Macromorfología	23
Obtención de exoantígenos	23
Tasa de crecimiento	24
Tamaño de los conidios	24
Análisis de datos fenotípicos	24
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	25
Identificación de especie de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	25
AFLP	27
Análisis de datos de AFLP	29
OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR	31
Purificación y reamplificación de las bandas seleccionadas obtenidas por AFLP	31
Clonación de fragmentos purificados	32
Caracterización directa de clonas por PCR en colonia	33
Purificación de plásmidos por método enzimático	33
Secuenciación	34
Estandarización de las condiciones para la PCR con el marcador SCAR	35
Evaluación de la sensibilidad del marcador SCAR	35
Especificidad del marcador SCAR	35
RESULTADOS	37
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	37
Macromorfología	37
Obtención de exoantígenos	38
Tasa de crecimiento	39
Tamaño de artroconidios	41
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	43
Extracción de DNA genómico	43
Identificación de especie de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	44
AFLP	48
Análisis de datos AFLP	52
OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR	55
Purificación y reamplificación de las bandas seleccionadas obtenidas por AFLP	55
Clonación de los fragmentos purificados	57
Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia	58
Purificación de plásmidos por método enzimático	59
Secuenciación	61
Comparación en el GenBank	62
Diseño de oligonucleótidos específicos para <i>Coccidioides</i>	63
Estandarización de las condiciones de PCR con el marcador SCAR	64
Sensibilidad del marcador SCAR	66

Epecificidad del marcador SCAR	66
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	75
APÉNDICE	87
Secuencias de los aislados de <i>C. posadasii</i> de México y Argentina	88
Matriz de datos binarios obtenida de los patrones polimórficos AFLP	95

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Fuente y origen geográfico de los aislados y cepa de referencia de <i>Coccidioides</i> spp.	21
Tabla 2. Tasa de crecimiento de aislados de <i>C. posadasii</i> .	40
Tabla 3. Tamaño de arthroconidios de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	42
Tabla 4. Estimadores de diversidad genética de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	53
Figura 1. Macromorfología de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	37
Figura 2. Producción de pigmento en aislados del género <i>Coccidioides</i>	38
Figura 3. Identificación de exoantígenos	39
Figura 4. DNA obtenidos de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	44
Figura 5. PCR de DNAs de <i>Coccidioides</i> spp. de acuerdo al método descrito por Umeyama <i>et al.</i> (2006)	45
Figura 6. PCR anidada de DNAs de <i>Coccidioides</i> spp. de acuerdo al método descrito por Bialek <i>et al.</i> (2004).	46
Figura 7. PCR de DNAs de <i>Coccidioides</i> spp. de acuerdo al método descrito por Bialek <i>et al.</i> (2004).	47
Figura 8. Identificación de los aislados de <i>C. posadasii</i> a través de inferencia filogenética	48
Figura 9. AFLP de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	49
Figura 10. AFLP de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	50
Figura 11. AFLP de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	50
Figura 12. AFLP de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	51
Figura 13. AFLP de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	51
Figura 14. AFLP de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	52
Figura 15. Dendrograma de los aislados de <i>C. posadasii</i> de México y Argentina	54
Figura 16. Red de haplotipos para aislados de <i>C. posadasii</i> utilizando el método de median-joining	55
Figura 17. Reamplificación de las bandas diferenciales seleccionadas de los patrones polimórficos obtenidos por AFLP	56
Figura 18. Clonas recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal	57
Figura 19. Caracterización de clonas recombinantes a través de PCR en colonia	58
Figura 20. Plásmidos obtenidos por método enzimático	59
Figura 21. Liberación del vector de clonación y de fragmentos ligados	60
Figura 22. Comparación en el GenBank de la secuencia obtenida para el marcador SCAR	62
Figura 23. Curva de concentración de DNA para PCR	65
Figura 24. PCR con el marcador SCAR E-AC/M-CAT ₃₀₀	65
Figura 25. Curva de sensibilidad del marcador SCAR E-AC/M-CAT ₃₀₀	66
Figura 26. Especificidad del marcador SCAR E-AC/M-CAT ₃₀₀	67

Resumen

Antecedentes. *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* causan la coccidioidomicosis, una enfermedad endémica del Continente Americano. Varios estudios sugieren una amplia variabilidad genética en estos hongos. Sin embargo hay poca información acerca de la variabilidad de aislados de *Coccidioides* procedentes de México (MX) y Argentina (AR). Por lo que, los objetivos de este trabajo fueron identificar la especie de aislados de *Coccidioides* spp. procedentes de MX y AR, analizar su variabilidad fenotípica y genotípica e investigar el modo de reproducción de *Coccidioides* y su nivel de diferenciación genética, así como, diseñar marcadores SCARs para la identificación de estos hongos.

Métodos. Se utilizaron 34 aislados de *Coccidioides* spp. de MX y AR fueron identificados taxonómicamente por análisis de inferencia filogenética, utilizando secuencias parciales del gen *Ag2/PRA*, y sus características fenotípicas fueron analizadas. La variabilidad genética, el modo de reproducción y el nivel de diferenciación genética se identificaron a través de marcadores AFLP. Se evaluó el nivel de variabilidad genética midiendo el porcentaje de loci polimórficos, número efectivo de alelos, heterocigocidad esperada y el Índice de Asociación (I_A). El grado de diferenciación genética fue determinado por AMOVA. Similitudes genéticas entre los aislados fueron estimados utilizando el índice de Jaccard. El algoritmo UPGMA se utilizó para construir el dendrograma correspondiente. Por último, se construyó una red de haplotipos para evaluar las relaciones genealógicas entre los haplotipos AFLP. Para la obtención del marcador SCAR, se utilizaron los patrones polimórficos AFLP, a partir de los cuales se identificaron bandas diferenciales para ambas especies de hongos. Posteriormente, éstas fueron reamplificadas, clonadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de hongos depositadas en el GenBank para descartar homología con otros hongos patógenos o no, para el humano. Con base en este análisis, se acotaron las secuencias iniciales de los fragmentos clonados, eliminando las secuencias compartidas y se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada especie. Se probó la especificidad y la sensibilidad de éstos, con DNA de otros hongos patógenos relacionados.

Resultados. Sólo dos (M4005 y M153), de los 34 aislados estudiados, correspondieron a la especie *C. immitis*, mientras que el resto fueron identificados como *C. posadasii*. No se observó variabilidad fenotípica entre los aislados de *C. posadasii* de MX y AR. Los diferentes estimadores de la variabilidad genética indicaron que los aislados de *C. posadasii* tienen una alta variabilidad genética. Asimismo, el análisis de AMOVA, el dendrograma y la red de haplotipos, mostraron una pequeña diferenciación genética entre las poblaciones de *C. posadasii* de MX y AR analizadas. Además, el I_A calculado para los aislados sugirió que éstos tienen un sistema reproductivo recombinante. El marcador SCAR (E-AC/M-CAT₃₀₀) obtenido fue específico para identificar *Coccidioides* spp., con una buena sensibilidad y especificidad.

Conclusiones. No se observó variabilidad fenotípica entre los aislamientos de *C. posadasii* MX y AR. La alta variabilidad genética observada en los aislamientos de MX y la AR y la pequeña diferenciación genética observada entre los aislados de *C. posadasii* analizados, sugieren que esta especie podría estar distribuida en una sola población genética en América Latina. El marcador E-AC/M-CAT₃₀₀ es una herramienta útil para identificar *Coccidioides* spp.

Abstract

Background. *Coccidioides immitis* and *C. posadasii* cause coccidioidomycosis, a disease that is endemic to North and South America, but for Central America, the incidence of coccidioidomycosis has not been clearly established. Several studies suggest genetic variability in these fungi; however, little definitive information has been discovered about the variability of *Coccidioides* fungi in Mexico (MX) and Argentina (AR). Thus, the goals for this work were to identify the species of these *Coccidioides* spp. isolates, analyse their phenotypic variability, examine their genetic variability and investigate the *Coccidioides* reproductive system and its level of genetic differentiation, as well as the design of SCARs markers to identify these fungi at the species level.

Methods. *Coccidioides* spp. isolates from MX and AR were taxonomically identified by phylogenetic inference analysis using partial sequences of the *Ag2/PRA* gene and their phenotypic characteristics analysed. The genetic variability, reproductive system and level of differentiation were estimated using AFLP markers. The level of genetic variability was assessed measuring the percentage of polymorphic loci, number of effective allele, expected heterozygosity and Index of Association (I_A). The degree of genetic differentiation was determined by AMOVA. Genetic similarities among isolates were estimated using Jaccard index. The UPGMA was used to construct the corresponding dendrogram. Finally, a network of haplotypes was built to evaluate the genealogical relationships among AFLP haplotypes. To obtain the SCAR marker were used polymorphic AFLP patterns, from which differential bands were identified for both species of fungi. Subsequently, these were reamplified, cloned and sequenced. The obtained sequences were compared to sequences deposited in GenBank fungi to discard homology to other fungal pathogens or not, for the human. Based on this analysis, reined initial sequences of the cloned fragments, eliminating shared sequences and specific oligonucleotide primers were designed for each species. We tested the specificity and sensitivity of these, with DNA from other pathogenic fungi related.

Results. All isolates of *Coccidioides* spp. from MX and AR were identified as *C. posadasii*. No phenotypic variability was observed among the *C. posadasii* isolates from MX and AR. Analyses of genetic diversity and population structure were conducted using AFLP markers. Different estimators of genetic variability indicated that the *C. posadasii* isolates from MX and AR had high genetic variability. Furthermore, AMOVA, dendrogram and haplotype network showed a small genetic differentiation among the *C. posadasii* populations analysed from MX and AR. Additionally, the I_A calculated for the isolates suggested that the species has a recombinant reproductive system. The SCAR marker (E-AC/M-CAT₃₀₀) obtained was specific to identify *Coccidioides*, with a good sensitivity and specificity.

Conclusions. No phenotypic variability was observed among the *C. posadasii* isolates from MX and AR. The high genetic variability observed in the isolates from MX and AR and the small genetic differentiation observed among the *C. posadasii* isolates analysed, suggest that this species could be distributed as a single genetic population in Latin America. The SCAR marker (E-AC/M-CAT₃₀₀) is a useful tool to identify isolates of *Coccidioides* spp.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Coccidioides*, *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* (Fisher *et al.*, 2002), son los agentes causales de la coccidioidomicosis, una enfermedad predominante del continente americano. Las zonas más afectadas por esta micosis son áreas endémicas del suroeste de los Estados Unidos, norte de México, algunas regiones de Centroamérica, (Pappagianis, 1988; Hector y Laniado-Laborín, 2005), y zonas endémicas importantes en Argentina (Canteros *et al.*, 2010a) y Brasil (Aguar Cordeiro 2006; Macedo, 2011).

La coccidioidomicosis es considerada una enfermedad emergente debido al incremento de la tasa de infección registrada en los últimos años (Hector *et al.*, 2011). En México, debido a que no es considerada una enfermedad de reporte obligatorio, no existen datos fidedignos sobre su incidencia. En otros países de Latinoamérica, como Argentina, también se ha visto un incremento de la enfermedad en los últimos años (Canteros *et al.*, 2010a). Por lo que es relevante el estudio de diversos aspectos biológicos de estos hongos, que ayuden a entender los brotes epidémicos, determinar variaciones en su virulencia y predecir la progresión de la enfermedad, así como desarrollar marcadores moleculares que puedan ser de utilidad en el diagnóstico de la misma. A continuación, se presentan los antecedentes más importantes sobre la biología de las especies de *Coccidioides*.

Taxonomía

La historia de la coccidioidomicosis se remonta a 1892, año en que Alejandro Posadas, al realizar un estudio histopatológico de un soldado argentino de nombre Domingo Escurra, observó un proceso crónico inflamatorio, con formación de granulomas epitelioides con células gigantes, similar al tuberculoso, pero que contenía formaciones quísticas muy parecidas a las producidas por los protozoarios del género *Coccidia*. De manera que,

Posadas, así como su professor el Dr. Wernicke, percibieron que este nuevo parásito no era idéntico a *Coccidia* y lo ubicaron como perteneciente al género *Psorosperma* (Negroni R, 2011). La enfermedad fue inicialmente denominada psorospermiasis infectante generalizada y este estudio fue motivo de varias publicaciones efectuadas en colaboración con el Dr. Wernicke (Posadas, 1892; Wernicke, 1892). Cuatro años después, Rixford y Gilchrist (1896) llevaron a cabo la descripción formal de *C. immitis*, a partir de un caso observado en California, no obstante, el patógeno seguía considerándose como un protozoario.

La primera aproximación a la correcta clasificación taxonómica de *C. immitis* fue realizada por Ophüls (1905), a partir de observaciones microscópicas del desarrollo del entonces considerado parásito, en medio de cultivo, concluyendo que se trataba de un hongo patógeno, clasificándolo como un ascomycete. Estos autores, además observaron la relación etiológica entre *C. immitis* y la coccidioidomicosis, demostrando que los artroconidios causaban la infección en diferentes animales de laboratorio. Sin embargo, la falta de un estado meiospórico *in vitro* o *in vivo*, en ese momento, dificultaba la clasificación taxonómica del hongo, hasta que Sigler y Carmichael (1976) reconocieron la similitud entre las esporas asexuales (artroconidios) de *C. immitis* y los aleurioconidios encontrados en el género mitospórico *Malbranchea* Sacc., colocando a *C. immitis* en el orden Onygenaceae, relación filogenética que fue confirmada posteriormente por métodos moleculares (Bowman *et al.*, 1992, Pan *et al.*, 1994, Bowman *et al.*, 1996). Hasta este momento, *C. immitis* era considerado como único agente etiológico de la coccidioidomicosis, sin embargo con el avance de las técnicas moleculares, diversos trabajos (Burt *et al.*, 1996; Burt *et al.*, 1997; Koufopanou *et al.*, 1997; Koufopanou *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2000a) se dirigieron al estudio de la variabilidad genotípica en

poblaciones de *C. immitis*, ya que la especie *C. posadasii* fue formalmente reconocida hasta que Fisher *et al.* (2002), a través de análisis filogenéticos utilizando SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), secuencias parciales de genes y microsatélites definieron la separación de dos especies, para los aislados procedentes de áreas endémicas de California se conservó el nombre de *C. immitis*, mientras que para los aislados procedentes de áreas endémicas de Arizona, Texas, México, y América del Sur, se asignó el de *C. posadasii*. Actualmente, de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (VIENNA CODE), adoptado por el 17 Congreso Internacional Botánico de Viena, celebrado en Viena, Austria, en julio de 2005, la clasificación taxonómica formalmente aceptada para las especies *C. immitis* y *C. posadasii* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum : Ascomycota

Clase : Eurotiomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae

Género: *Coccidioides*

Especies: *Coccidioides immitis*

Coccidioides posadasii

Hábitat de *Coccidioides* spp.

Los primeros trabajos en describir las características del hábitat de *Coccidioides* fueron los realizados por Egebert *et al.* (1964) y Elconin *et al.* (1964), quienes estudiaron el efecto de

la salinidad sobre el crecimiento de *C. immitis*. Estos autores obtuvieron aislados a partir de muestras de suelos superficiales de zonas endémicas, asociados con una marcada elevación en las concentraciones de sales solubles en estos suelos, por lo que sugirieron que las elevadas concentraciones de sales son un factor determinante para el desarrollo de estos hongos. Asimismo, en un estudio de la ecología de suelo asociado a la presencia de *C. immitis* realizado por Lacy y Swatek (1974), se demostró que las características del suelo donde habita el hongo son suelos alcalinos y textura arenosa, lo que coincidía con los trabajos previos de Egebert *et al.* (1964) y Elconin *et al.* (1964).

Un trabajo más reciente realizado por Fisher *et al.* (2007), confirmó que el hábitat para *Coccidioides* en zonas endémicas son suelos alcalinos con niveles importantes de nutrientes esenciales como hierro, calcio y magnesio, y encontraron evidencias acerca de que este hongo es capaz de crecer en la mayoría de los tipos de suelo del desierto y tiene alta tolerancia a pH bajo y temperaturas extremas que pueden ir de -40.0 a 48.8°C, en el aire, o en el suelo en un rango de temperaturas bajo cero hasta 80°C. Los autores consideran que el conjunto de los factores abióticos en zonas endémicas del hongo pueden crear un ambiente favorable para el desarrollo de *Coccidioides*, ya que un mayor contenido orgánico puede aumentar los nutrientes disponibles, la alta salinidad puede reducir la competencia con otros microorganismos, las altas temperaturas también pueden reducir el número de bacterias y por lo tanto la competencia, y altas concentraciones de borato de sodio pueden ser antisépticas para algunos microorganismos del suelo, pero no para *Coccidioides*.

Por otro lado, Baptista-Rosas *et al.* (2007) mediante el uso de una combinación de variables ambientales y puntos de referencia geoespacial en Estados Unidos y México, donde se han obtenido aislamientos, generaron un modelo de distribución posible de *Coccidioides* spp. y sugieren que el nicho ecológico más probable para estos hongos se encuentra en las tierras

áridas de los desiertos de América del Norte, lo que coincide con las áreas de mayor incidencia de la enfermedad y con los hallazgos antes reportados por otros autores (Egebert *et al.*, 1964; Elconin *et al.*, 1964; Lacy y Swatek, 1974).

Caracterización fenotípica de *Coccidioides*

Los primeros trabajos orientados a la caracterización fenotípica de aislados de *C. immitis*, datan de hace varias décadas. Friedman *et al.* (1956), determinaron la virulencia de 27 aislados de *C. immitis* en ratones, sus resultados mostraron que existían diferencias en la virulencia, entre los diferentes aislados analizados.

Asimismo, Friedman y Smith (1957) probaron la virulencia de cuatro aislados de *C. immitis* en ratones, inoculando los ratones por vía intraperitoneal, con una suspensión de partículas viables de cada aislado del hongo, y calculando la virulencia a través del porcentaje de animales muertos, treinta días después de la inoculación. Sus resultados también mostraron diferencias en la virulencia entre los diferentes aislados.

Por otro lado, Roessler *et al.* (1961), también realizaron ensayos de virulencia de 37 cepas de *C. immitis*, utilizando huevos embrionados de pollo y mostraron que los valores de la DL₅₀ (Dosis Letal 50), se encontraban entre 4 y 2800 partículas viables, indicando también una alta variabilidad en la virulencia de los diferentes aislados.

Rowe *et al.* (1963), analizaron antígenos solubles extraídos de varias cepas de *C. immitis*, empleando diferentes procedimientos y los antígenos fueron probados por la técnica de doble difusión, utilizando suero de pacientes con coccidioidomicosis. Los autores encontraron que el hongo contenía varios antígenos solubles diferentes, capaces de formar precipitados con sueros con altos títulos de fijación del complemento, evidenciando diferencias antigénicas entre las cepas analizadas.

Considerando estos antecedentes, que sugerían diferencias en la virulencia y variación antigénica entre diferentes aislados de *C. immitis*, aunado al advenimiento de la biología molecular, surgieron otros trabajos también enfocados a la caracterización fenotípica de este hongo. Peng *et al.* (1999), analizaron los antígeno de pared celular de *C. immitis*, obtenidos a partir de aislados seleccionados de diferentes fuentes y origen geográfico, a través de la secuenciación del gene que codifica para el antígeno Ag2/PRA (Proline-Rich Antigen), sus resultados mostraron diferencias en la composición de aminoácidos de estas proteínas antigénicas.

Asimismo, Fisher *et al.* (2002) mostraron que los aislados No-California, denominados como *C. posadasii*, crecían más lentamente que los aislados California, conocidos actualmente como *C. immitis*, cuando se incrementaba la concentración de NaCl en el medio de cultivo. Además, el tamaño de los artroconidios, no mostró diferencias significativas entre los dos grupos de aislados.

Otro estudio realizado por Cordeiro *et al.* (2006), enfocado a la caracterización fenotípica de aislados de *Coccidioides* spp. recuperados de suelo en el estado de Ceará (Brasil), mostró colonias con textura glabra, aterciopelada o algodonosa y una cantidad importante de artroconidios. Las tasas de crecimiento de los aislados en medio conteniendo 8.0% de NaCl fueron bajas y su tolerancia al pH varió entre 4.0 y 11.0. Además, observaron una ausencia total de crecimiento en medios suplementados con ácido L-aspártico y L-histidina y todos los aislados probados fueron positivos para la producción de ureasa. En consecuencia, los autores concluyeron que *Coccidioides* spp. es un organismo fisiológicamente muy versátil.

Por otro lado, Ramani y Chaturvedi (2007) compararon perfiles de susceptibilidad a varios antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, voriconazol,

posaconazol y caspofungina) en cepas de *C. immitis* y *C. posadasii*. Los valores de MIC (Minimal Inhibitory Concentration) y de MFC (Minimum Fungicidal Concentrations), no revelaron diferencias significativas entre ambas especies, de manera que evidenciaron alta susceptibilidad a la mayoría de los antifúngicos probados.

De acuerdo con lo que se conoce hasta el momento, las especies de *Coccidioides* son organismos fenotípicamente indistinguibles a pesar de que existe cierta variabilidad fenotípica entre éstos y son considerados organismos fisiológicamente versátiles.

Variabilidad genética de *Coccidioides* spp.

Uno de los aspectos de *Coccidioides* spp., que quizá es de los más estudiados hasta la fecha, es su variabilidad genética y los primeros trabajos en abordarla sólo consideraron la especie *C. immitis*, ya que como se mencionó antes, la especie *C. posadasii* fue formalmente reconocida hasta 2002. El primer trabajo en analizar la variabilidad genética de aislados de *C. immitis*, fue el descrito por Zimmerman *et al.* (1994), quienes utilizaron RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic) para estudiar el DNA de 15 aislados clínicos de California. Sus resultados mostraron diversidad genética entre los aislados, ya que encontraron un patrón RFLP similar entre 13 de los 15 aislados estudiados y los dos aislados restantes constituyeron otro patrón.

Por otro lado, Burt *et al.* (1996) evidenciaron también un patrón de variabilidad genética entre 25 aislados de *C. immitis* obtenidos de pacientes de un hospital en Tucson, AZ, a través de la amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos arbitrarios y la detección de SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism). Este mismo grupo de investigadores en otro trabajo, aportaron información acerca de la estructura de poblaciones, en tres grupos de aislados de *C. immitis* obtenidos en Arizona, California y Texas, empleando MLST

(Multilocus Sequence Typing). Sus resultados evidenciaron una diferenciación genética entre los aislados estudiados y un nivel muy bajo de flujo de genes entre las poblaciones (Burt *et al.*, 1997).

Recientemente, ha sido descrita información importante sobre el genoma de *Coccidioides* spp. (Sharpton *et al.*, 2009; Neafsy *et al.*, 2010) que confirma la existencia de una variabilidad genética relevante en ambas especies. Algunos de los hallazgos más importantes de estos estudios revelaron que el tamaño del genoma de *C. immitis* es de 28.9 Mb, mientras que en *C. posadasii* es de 27 Mb. Asimismo, encontraron diferencias especie-específicas entre los genomas de ambas especies, por ejemplo, identificaron 10,355 genes en *C. immitis* y 7,229 en *C. posadasii*, mientras que 282 genes especie-específicos pertenecen a *C. immitis* y 66 a *C. posadasii*. De esta manera, la secuenciación de sus genomas completos, mostró que éstos albergan una importante variabilidad genética.

Modo de reproducción de *C. immitis*

Las primeras evidencias moleculares sobre la existencia de recombinación en *C. immitis* fueron aportadas por Burt *et al.* (1996), quienes utilizaron SWAPP (Sequencing With Arbitrary Primer Pairs), en conjunción con SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), para el estudio de aislados de *C. immitis* procedentes de Tucson, Arizona. Por otro lado, Koufopanou *et al.* (1997; 1998), a través de la secuenciación de fragmentos de cinco genes nucleares, con una muestra de 17 aislados de *C. immitis* y un análisis de la genealogía de cada uno de los cinco locus examinados, mostraron una longitud mínima entre ellos, indicativa de no recombinación; sin embargo, cuando analizaron la genealogía a través de los loci en su conjunto, sí encontraron evidencias de recombinación.

Fisher *et al.* (2000b), analizaron los SNPs (Single-Nucleotide Polymorphisms) y los STRs (Short Tandem Repeats) de aislados de *C. immitis*, para aportar datos sobre su modo de reproducción. Sus resultados mostraron una amplia diversidad genética multilocus en dos de los loci estudiados y una estructura de población coherente con una población recombinante.

Por otro lado, el trabajo de Fisher *et al.* (2002), quienes a través de microsatélites y con un número considerable de aislados de *Coccidioides* spp. procedentes de diversas regiones geográficas, evidenció una vez más la separación de dos taxa correspondientes a dos especies filogenéticas, *C. immitis* y *C. posadasii*, y además corroboró que *C. posadasii* representaba un clado monofilético recombinante.

Los trabajos más recientes, que apoyan la existencia de recombinación en las especies del género *Coccidioides*, son los realizados por Fraser *et al.* (2007) y Mandel *et al.* (2007), quienes han demostrado la presencia de locus *MAT*, potencialmente funcional con dos ideomorfos *MAT1-1* y *MAT1-2*, lo que hace cada vez más cercana la posibilidad de que se encuentre su fase sexual.

Especiación de *Coccidioides* spp.

Los primeros trabajos en evidenciar la especiación de *Coccidioides* spp., fueron los de Koufopanou *et al.* (1997, 1998, 2001), quienes utilizaron secuencias parciales de genes conocidos y demostraron la existencia de especies crípticas en el género *Coccidioides*. Sin embargo, fue el trabajo desarrollado por Fisher *et al.* (2002), el que corroboró la separación del género *Coccidioides*, en dos especies filogenéticas distintas: *C. immitis* y *C. posadasii*.

Epidemiología de la coccidioidomicosis en Latinoamérica

En México la coccidioidomicosis no es una enfermedad de reporte obligatorio, por lo que su incidencia real se desconoce. Uno de los estudios epidemiológicos más importantes, fue el realizado por González-Ochoa (encuesta nacional 1961-1965), a través de la intradermorreacción con coccidioidina, en el que definió la distribución de la coccidioidomicosis en tres zonas endémicas en el país, la zona norte, la zona de la costa del pacífico y la zona central, con tasas variables de infección en diversos estados de la República Mexicana. Ésta es, hasta el momento, la referencia más importante sobre la distribución geográfica de las principales áreas endémicas en México (Laniado-Laborín, 2006).

Se han realizado en México, pocos estudios clínico-epidemiológicos orientadas a determinar la frecuencia de la coccidioidomicosis, y los datos sobre esta micosis están restringidos a la publicación de casos clínicos y a estudios retrospectivos en diferentes centros hospitalarios (Baptista-Rosas y Riquelme, 2007; Laniado-Laborín, 2007; Méndez-Tovar *et al.*, 2007; Mondragón-González *et al.*, 2005; Muñoz-Hernández *et al.*, 2004, 2008). No obstante Baptista-Rosas y Riquelme (2007), de acuerdo con los datos de la situación epidemiológica de la coccidioidomicosis en México, previos a 1994, ya que desde 1995, no se tienen registros, estiman anualmente más de 1500 casos de coccidioidomicosis primaria y 15 casos de enfermedad diseminada. Por lo que suponen que la situación actual de la enfermedad puede haber seguido un desarrollo parecido al de los Estados Unidos, donde las altas tasas de prevalencia e incidencia se dispararon a partir del inicio de la década de los noventa.

Por lo que respecta al resto de los países latinoamericanos, la situación epidemiológica no es diferente, ya que existen pocos estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad. En

Brasil, Cordeiro *et al.* (2009), a través de una encuesta serológica con 229 voluntarios en el noreste de este país, encontraron un 7.42% de muestras positivas y mostraron una relación directa asociada a zonas endémicas. Asimismo, el reporte de casos también ha proporcionado información acerca de esta enfermedad en el país (Hideo-Togashi *et al.*, 2009).

En Argentina, quizá, uno de los trabajos más informativos es el de Canteros *et al.* (2010), quienes a través de un estudio retrospectivo de los casos de coccidioidomicosis desde 1892 hasta 2009, demostraron un aumento en el número de casos en este periodo y la proponen como una enfermedad emergente en el país.

Diagnóstico de la coccidioidomicosis

La coccidioidomicosis se inicia con un cuadro respiratorio agudo, en general benigno, y cura espontáneamente. Sin embargo, puede evolucionar hacia formas progresivas que diseminan a los tejidos cutáneo, subcutáneo, visceral y óseo. Las formas severas y con alta morbimortalidad están asociadas a pacientes inmunocomprometidos (Laniado-Laborín *et al.*, 2012). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad pueden ser confundidas con otras entidades nosológicas, como la histoplasmosis y la tuberculosis, lo que dificulta su diagnóstico, por lo que un diagnóstico rápido y confiable apoyaría un tratamiento oportuno. El diagnóstico de la coccidioidomicosis se ha fundamentado, tradicionalmente, en los resultados de una combinación de datos clínicos, estudios de gabinete y de laboratorio. Los estudios de gabinete (imagenológicos) usualmente proporcionan un diagnóstico presuntivo, mientras que los procedimientos de laboratorio son necesarios para establecer la etiología de la enfermedad. El diagnóstico definitivo se realiza, de preferencia, por el aislamiento del agente causal en las muestras clínicas, pero esto resulta difícil en las primeras etapas de la

enfermedad; puesto que el crecimiento del hongo es tardío y hay que esperar hasta seis semanas para identificarlo en cultivo. Tales inconveniencias hacen necesario recurrir a métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la presencia del agente etiológico o de sus productos, en muestras del paciente. Por tal motivo, desde hace varios años se han utilizado los procedimientos inmunológicos (Pappagianis y Zimmer, 1990), como herramienta alternativa, a pesar de presentar algunas limitaciones, como reacciones cruzadas con otras especies de hongos causantes de cuadros clínicos semejantes. El análisis histopatológico de tejido es otra opción diagnóstica, pero su buena interpretación depende del muestreo adecuado, de la experiencia del observador y de la coloración histoquímica apropiada (Muñoz-Hernández *et al.*, 2008). De manera que, se ha hecho necesario el desarrollo de pruebas que permitan descartar mimetismo antigénico o morfológico de este organismo con otros agentes que producen cuadros clínicos similares (Millar *et al.*, 2003). Entre estas pruebas se incluyen la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con sondas específicas. Una de las primeras sondas fue diseñada con base en una subunidad pequeña del rDNA (SSU) que permitió reconocer el género *Coccidioides* (Greene *et al.*, 2000) y discriminarlo de hongos morfológicamente similares del orden Onygenales (Pan *et al.*, 1994), sin embargo, a partir del conocimiento de las dos especies, varios autores han diseñado sondas para la identificación de cada una de ellas.

Identificación molecular de *Coccidioides*

El primer trabajo orientado a la identificación de las dos especies, fue el realizado por Fisher *et al.* (2002) quienes a través de la utilización de microsatélites, mostraron que los microsatélites, denominados GAC y 621, eran diagnósticos para las especies *C. immitis* y *C. posadasii*, respectivamente. Bialek *et al.* (2004) diseñaron una sonda con base en la secuencia del gen *Ag2/PRA* que permite el reconocimiento de *C. posadasii*, sin embargo,

estos autores no incluyeron cepas de *C. immitis* para confirmar su especificidad. Por otro lado, Umeyama *et al.* (2006) desarrollaron oligonucleótidos específicos para las dos especies con base en una región de DNA no especificada, pero que discrimina entre éstas con base en el tamaño del fragmento amplificado.

Otra herramienta molecular que ha recibido poca atención, es el operón ribosomal. Greene *et al.* (2000), diseñaron oligonucleótidos con base en la región ITS para *C. immitis*, pero no reportaron la secuencia en *C. posadasii*. Asimismo, Tintelnot *et al.* (2007) diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de las regiones ITS del rDNA (NS7-ITS2, ITS1-ITS4, ITS2-ITS5, ITS3-ITS4, ITS4-ITS5, ITS3-R635 y F63-R635) y de todos los oligonucleótidos probados, sólo los ITS3 y 4 diferenciaron las dos especies. Sin embargo, a pesar de los marcadores moleculares desarrollados hasta el momento, ninguno ha sido estandarizado para ser utilizado en la identificación especie-específica, por lo que se continua en la búsqueda de éstos.

Varios investigadores han obtenido marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) a partir de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), y RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), estos marcadores son diseñados con base en una secuencia conocida del genoma del organismo en estudio, pueden representar un solo locus en el genoma. Los marcadores SCAR resultan útiles en la construcción de bibliotecas genómicas, en el control biológico para estudiar la persistencia de cepas en el ambiente y en la identificación de híbridos en plantas. Por lo tanto, este método es una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y específicos que pueden ser utilizados para identificar hongos, como ha sido descrito por varios autores (Abbasi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Linde *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001, 2002).

Recientemente, Frías De León *et al.* (2012) obtuvieron marcadores SCARs generados por RAPD-PCR, para detectar el hongo *Histoplasma capsulatum*. Estos marcadores resultaron ser altamente específicos y sensibles para detectar el hongo en muestras clínicas y en muestras de diferentes fuentes de infección, por lo que este tipo de marcadores podrían ser una alternativa interesante en el caso de la coccidioidomicosis.

JUSTIFICACIÓN

La coccidioidomicosis es considerada una enfermedad emergente en los Estados Unidos de América, debido al incremento de la tasa de infección registrada en los últimos años (Laniado-Laborín, 2007; Hector *et al.* 2011). En el resto del continente americano la situación de la coccidioidomicosis está prácticamente inexplorada. En México, debido a que desde 1994, dejó de ser una enfermedad de reporte epidemiológico obligatorio y no existen estudios recientes que determinen su prevalencia e incidencia, la situación de la enfermedad en las áreas endémicas es poco conocida. El estado de Baja California presenta alta prevalencia entre la población pediátrica, ya que estudios realizados en Tijuana, mostraron un 10% de reactivos a la coccidioidina en esta población (Laniado-Laborín *et al.*, 1991). Por otro lado, la enfermedad comparte características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas con otros padecimientos, lo que dificulta notablemente el tratamiento en caso de no contar con los medios diagnósticos microbiológicos adecuados.

En Argentina, la situación epidemiológica no es diferente, son escasos los estudios existentes y es en los últimos años, que se han realizado algunos estudios epidemiológicos, entre éstos los realizado por Canteros *et al.* (2010; 2010a), quienes hicieron un trabajo para reconocer las áreas para micosis endémicas, en 10 comunidades rurales del área denominada interfluvio Teuco-Bermejito, provincia del Chaco y una amplia revisión retrospectiva del total de casos de coccidioidomicosis documentados en Argentina desde el año 1892 hasta 2009 y mostraron que entre 2006 y 2009, la tasa de incidencia en la provincia de Catamarca se incrementó desde valores históricos inferiores a 0,5 hasta 2,0 casos cada 100 000 habitantes, lo que sugiere a la coccidioidomicosis como una enfermedad emergente en esta área.

Tanto en México, como en Argentina, no existen trabajos que revelen la estructura de poblaciones de *Coccidioides*, ya que como se ha mencionado, la situación epidemiológica actual de la coccidioidomicosis se desconoce. Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes, en los cuales se ha demostrado una estructura de población consistente con la recombinación y el sexo críptico en este hongo, el estudio de la diversidad genética y de su estructura de poblaciones, en los aislados de México y Argentina, es importante para entender los brotes epidémicos, determinar variaciones en su virulencia y predecir la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, las manifestaciones clínicas de la coccidioidomicosis pueden ser confundidas con otras entidades nosológicas, lo que dificulta su diagnóstico. Un diagnóstico rápido y confiable apoyaría un tratamiento oportuno, además de facilitar la identificación de fuentes de infección y la consolidación de la información epidemiológica de esta micosis. A pesar de que existen numerosas pruebas de laboratorio para la identificación de *Coccidioides*, todas presentan limitaciones, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, por lo que es indispensable disponer de marcadores moleculares evaluados y estandarizados que permitan la detección del patógeno, ya que en los países latinoamericanos, como México y Argentina, se carece de este tipo de herramientas. A pesar de que se han reportado en la literatura varias sondas moleculares de *Coccidioides*, todas tienen ciertos inconvenientes, ya sea intrínsecos (sensibilidad, especificidad, variabilidad genética) o extrínsecos (costo, tecnología utilizada, etc.) por lo que obtener marcadores moleculares específicos y sensibles, como los marcadores tipo SCAR, permitiera el desarrollo de ensayos rápidos y certeros para el diagnóstico e identificación de las especies de *Coccidioides*.

HIPÓTESIS

Los aislados de *Coccidioides* spp. procedentes de México y Argentina, no se encuentran estructurados genéticamente de acuerdo con su origen geográfico.

Los marcadores SCARs obtenidos a partir de los patrones polimórficos de AFLP de aislados de *Coccidioides* spp. son específicos para la identificación de estos hongos.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evidenciar la variabilidad genética y la estructura de poblaciones de aislados de *Coccidioides* spp. procedentes de México y Argentina con base en el análisis de los patrones polimórficos generados por AFLP.
2. Obtener sondas tipo SCAR a partir de los patrones polimórficos generados por AFLP, de aislados de *Coccidioides* spp. procedentes de México y Argentina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar por métodos fenotípicos los aislados de *Coccidioides* spp.
2. Identificar la especie de los aislados del género *Coccidioides*, utilizando las sondas reportada por Umeyama *et al.* (2007) y Bialek *et al.* (2006).
3. Determinar la variabilidad genética y la estructura de poblaciones de los aislados de *C. posadasii* a partir de patrones AFLP.
4. Comparar, por AFLP, los aislados identificados como *C. immitis* y *C. posadasii* para obtener bandas diferenciales que permitan identificar cada especie.

5. Obtener marcadores SCAR a partir de las bandas diferenciales generadas por AFLP de aislados de *C.immitis* y *C. posadasii* de México y Argentina.
6. Valorar la especificidad de los marcadores SCAR con todos los aislados previamente tipificados como *C. immitis* y *C. posadasii* y con DNA de especies fúngicas estrechamente relacionadas y agentes de patologías con cuadros clínicos semejantes a la coccidioidomicosis.
7. Determinar la sensibilidad de los marcadores SCARs con DNA de *C. posadasii*

MATERIALES Y MÉTODOS

Hongos

Fueron utilizados 33 aislados clínicos de *Coccidioides* spp. y una cepa de referencia; 23 aislados procedentes de México y 11 aislados procedentes de Argentina. La fuente y origen geográfico se muestran en la Tabla 1. Los aislados y cepa de referencia se depositaron en la Colección de *Coccidioides* spp. del Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Tabla1. Fuente y origen geográfico de los aislados y cepa de referencia de *Coccidioides* spp.

Aislado	Fuente	Origen Geográfico
M0104 ^a	Catéter de derivación peritoneal	Distrito Federal, MX
M1204 ^b	Espuito	Durango, MX
M1404 ^b	LCR	Torreón, MX
M1504 ^b	LCR	Torreón, MX
M2305 ^b	Secreción pleural	Torreón, MX
M2805 ^b	LBA	Torreón, MX
M3005 ^b	Espuito	Torreón, MX
M3905 ^c	ND	Baja California, MX
M4005 ^c	Secreción de herida	Guadalajara, MX
M5406 ^d	ND	Tijuana, MX
M5708 ^e	ND	San Luis Potosí, MX
HU1 ^f	ND	Monterrey, MX
HU2 ^f	ND	Monterrey, MX
HU11 ^f	LBA	Monterrey, MX

HU12 ^f	LBA	Monterrey, MX
HU18 ^f	Secreción articular	Monterrey, MX
HU19 ^f	Secreción bronquial	Monterrey, MX
HU24 ^f	Espujo	Monterrey, MX
M153 ^g	ND	MX
37.3 ^g	ND	MX
5256 ^g	ND	MX
SiFe ^g	ND	ND
MA ^h	LBA	Campeche, MX
972579 ⁱ	Biopsia de ganglio	Catamarca, AR
073089 ⁱ	LBA	Catamarca, AR
073094 ⁱ	LCR	Mendoza, AR
073129 ⁱ	Biopsia de pie	Salta, AR
073130 ⁱ	Hemocultivo	Catamarca, AR
073131 ⁱ	Biopsia de pulmón	La Rioja, AR
083376 ⁱ	LBA	Catamarca, AR
083377 ⁱ	Biopsia de piel	Catamarca, AR
083380 ⁱ	Absceso de pierna	Catamarca, AR
083382 ⁱ	Ganglio	Santiago del Estero, AR
083381 ⁱ	Espujo	Catamarca, AR

^aInstituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; ^bUMAE Hospital de Especialidades No. 71, Instituto Mexicano del Seguro Social; ^cInstituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud; ^dClínica Derma Care; ^eHospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"; ^fHospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León; ^gDepartamento de Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"; ^hInstituto Nacional de Pediatría; ⁱInstituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; LCR-líquido cefalorraquídeo; LBA-lavado broncoalveolar; ND-no determinado; MX-México; AR-Argentina

Obtención de cultivos monospóricos

A partir de cada aislado, crecido durante 1-2 semanas en agar-Mycobiotic (Bioxón®, DF, México) a 30°C, se obtuvo una suspensión de conidios en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7.4) adicionado de 0.05% Tween 20 (PBST). Esta suspensión fue diluída 1:1000 y se tomaron 50 µL para plaquear en caja de Petri conteniendo medio agar-Mycobiotic (Bioxón). Las cajas fueron incubadas a 30°C y revisadas hasta observar crecimiento colonial, se seleccionó una colonia aislada por cada placa, y ésta fue transferida a otra caja, crecida y conservada como se describió anteriormente.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Macromorfología

Los aislados de *Coccidioides* spp. se cultivaron en YEG-agar (1 % extracto de levadura, 1 % glucosa, 1.5 % agar) a 30°C durante 10 días, posteriormente se observaron las características morfológicas de cada cultivo (color y textura de la colonia).

Obtención de exoantígenos

La obtención de exoantígenos se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Kaufman *et al.* (1987). Para demostrar la identidad antigénica de los aislados de *Coccidioides* que fueron utilizados en este estudio, con los exoantígenos obtenidos se llevó a cabo el método inmunológico de doble inmunodifusión en gel descrito por Ouchterlony y Nilsson (1978). Para esta prueba inmunológica se utilizaron sueros testigos positivos y negativos, así como un antígeno de referencia. La identificación inmunológica de las

coccidioidinas se efectuó con base en la aparición de las bandas de identidad, comparadas con el antígeno de referencia (Taylor *et al.*, 2005).

Tasa de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento, cada aislado fue crecido en cajas de Petri con medio agar-YEG (extracto de levadura-peptona-glucosa) durante 10 días, y de cada caja se cortaron círculos de 7 mm de diámetro en el margen de la colonia, y cada uno de éstos fue colocado en el centro de una caja de Petri conteniendo medio agar-YEG con diferentes concentraciones de NaCl 0 M (0 %), 0.034 M (2 %), 0.068 M (4 %) y 0.102 M (6 %). Las cajas fueron incubadas a 30°C. El crecimiento fue determinado midiendo el diámetro (cm) de las colonias a los 4, 8, 10 y 15 días. Cada experimento se llevó a cabo cuatro veces. Posteriormente se determinó la tasa de crecimiento de los aislados empleando la fórmula: [(diámetro de la colonia – diámetro del inóculo)/15 días de incubación].

Tamaño de los conidios

Los cultivos fueron crecidos en agar-YEG, durante 10 días a 30°C, para permitir la esporulación, después se procedió a tomar una muestra de cada colonia y se colocó en un tubo de 50 mL (Nunc, Naperville, IL, USA) que contenía perlas de vidrio de 0.3 mm de diámetro y 10 ml de PBST para disgregar el micelio. Enseguida se colocó una muestra de la suspensión en un portaobjetos mezclada con azul de algodón lactofenol, se colocó un cubreobjetos y la preparación fue sellada con barniz de uñas transparente. Posteriormente, se midieron 40 arthroconidios de cada aislado con un micrómetro ocular calibrado (Olympus America Inc., Melville, N. Y.).

Análisis de datos fenotípicos

El análisis de los datos obtenidos para la tasa de crecimiento se efectuó mediante el programa MATLAB ver. 6.1 (Mathworks, Inc., Natick, MA, US). Se utilizó un diseño factorial de dos vías (two ways) con medidas repetidas, para evaluar los tiempos de incubación (en días) y las diferentes concentraciones de NaCl en el medio de cultivo para determinar si existían diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los diferentes aislados. Además, los aislados fueron analizados comparando las tasas de crecimiento y considerando el país de procedencia. Para detectar diferencias significativas en el tamaño de los conidios, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha = 0.01$ y 0.05) y la prueba de comparación múltiple de Tukey. El análisis fue realizado con el programa SPSS (Statistical Package for Social del Sciences) versión 12.0 (Montgomery, 1991).

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Identificación de especie para los aislados de *Coccidioides* ssp.

Para la identificación de los aislados de *Coccidioides* spp., a nivel de especie, se utilizaron dos estrategias: en la primera se utilizó el método descrito por Umeyama *et al.* (2006), que permite identificar *C.immitis* de *C. posadasii*, simplemente comparando los tamaños del amplicón obtenido por PCR en un gel de agarosa; para la segunda estrategia, se utilizó el método descrito por Bialek *et al.* (2004), que permite la identificación de *C. posadasii* a través de una PCR anidada, además por un lado, se secuenció el amplicón de 526 pb de todos los aislados obtenidos en la primera PCR y se analizaron como describe Canteros *et al.* (2009); y por el otro estas secuencias se utilizaron para realizar la identificación a través de una inferencia filogenética.

Para el método descrito por Umeyama *et al.* (2006), se utilizaron las siguientes condiciones: 10 ng de DNA en un volumen de reacción de 25 μ L, conteniendo amortiguador IX, 200 μ M de dNTPs (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA), 1 mM de $MgCl_2$, 1.0 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 50 pmol de cada oligonucleótido (Coi9-1F-5'-TAC GGT GTA ATC CCG ATA CA-3' y Coi9-1R-5'-GGT CTG AAT GAT CTG ACG CA-3'), con el siguiente programa; un ciclo a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, y 72 °C por 45 s con un paso de extensión final a 72 °C por 3 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift[®] Maxi[™] Thermal Cycler Block (Micro Pte. Ltd. ver. 1). Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1.5 % en amortiguador 0.5 X Tris-Borato-EDTA a 100 V por 60 min. Se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA). El gel fue visualizado en un sistema de fotodocumentación Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc., CA).

Para el método descrito por Bialek *et al.* (2004), las condiciones fueron las siguientes: para la primera reacción de PCR, se utilizaron 10 ng de DNA en un volumen de reacción de 25- μ L, conteniendo amortiguador 1X, 200 μ M de dNTPs (Applied Biosystems), 2.5 mM de $MgCl_2$, 1.0 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 100 pmol de cada oligonucleótido, CoI (5'-GTA CTA TTA GGG AGG ATA ATC GTT-3') y CoII (5'-GGT CTG AAT GAT CTG ACG CA-3'). El siguiente programa fue utilizado para la PCR: un ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min. La segunda reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L, 2 μ L del producto de la primera PCR, amortiguador 1X, 200 μ M de dNTPs (Applied Biosystems), 1.5 mM de $MgCl_2$, 1 U de *Taq* polimerasa (Applied

Biosystems) y 100 pmol de cada oligonucleótido, CoIII (5'-ATC CCA CCT TGC GCT GTA TGT TCGA-3') y CoIV (5'-GGA GAC GGC TGG ATT TTT TAA CAT G-3'). Para la segunda PCR, se utilizó el siguiente programa: un ciclo a 94 °C por 5 min seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con un paso de extensión final a 72 °C por 5 min. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift[®] Maxi[™] thermocycler (Micro Pte. Ltd. ver. 1). Los productos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1.5% con amortiguador TBE 0.5X a 100 V por 60 min. Se utilizó el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen) para determinar el tamaño molecular de los productos. El gel fue visualizado en un fotodocumentador de imágenes Gel Doc XR (Bio-Rad).

Para confirmar la identidad de todos los aislados, los amplicones de 526-bp, obtenidos de la primera PCR, fueron purificados utilizando el kit QIAquick PCR kit (Qiagen) y enviados para secuenciar a la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, utilizando un secuenciador automatizado ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron editadas usando el programa Chromas Lite 2.3 software (<http://www.technelysium.com.au>) y el alineamiento de las secuencias fue analizado utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para comprobar las identidades entre las secuencias de todos los aislados depositados en la base de datos GenBank.

AFLP

Las reacciones de AFLP se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Vos *et al.* (1995) y Duarte-Escalante *et al.* (2013). Se utilizó el Kit GIBCO BRL AFLP System I de la manera siguiente. Los DNAs obtenidos se ajustaron a una concentración de 500 ng/18µL, éstos fueron digeridos simultáneamente con las enzimas de restricción *EcoRI/MseI* (1.25

U/ μ L) durante dos horas a 37°C y posteriormente las enzimas de restricción se inactivaron a 70°C durante 15 minutos. Los fragmentos de DNA derivados de la digestión fueron ligados a adaptadores de doble hebra *EcoRI* F (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'), *EcoRI* R (3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'); *MseI* F (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'), *MseI* R (3'-TACTCAGGACTCAT-5') con T4 ligasa por 2 h a 20°C, y así generar templados de DNA que se utilizaron en amplificaciones posteriores. Las secuencias de los adaptadores asociadas a los sitios de restricción sirvieron como sitios de enlace de oligonucleótidos para efectuar dos amplificaciones subsecuentes por PCR. De la mezcla anterior se realizó una dilución 1:10, que fue utilizada en la preamplificación.

En la reacción de preamplificación, se utilizaron 5 μ L de la dilución anterior, 40 μ L de la mezcla pre-amp primer [*EcoRI* (5'-GACTGCGTACCAATTC+A-3'); *MseI* (5'-GATGAGTCCTGAGTAA+C-3')], 5 μ L del amortiguador 10X PCR [MgCl₂ 15 mM] y 1 μ L de Taq DNA polimerasa [1U/ μ L] y se realizó una PCR, que consistió de un ciclo de 3 min a 94°C; 20 ciclos de: 30 s a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C. Los productos de PCR obtenidos en la preamplificación fueron diluidos 1:5 y usados como templados en una segunda amplificación (amplificación selectiva), en donde se usaron seis combinaciones de oligonucleótidos (E+AA:M+CAC; E+AA:M+CAT; E+AA:M+CTG; E+AA:M+CTC; E+AC:M+CAT; E+AC:M+CTC), que además de reconocer la región del adaptador y del sitio de restricción, contienen dos y tres nucleótidos específicos adicionales.

El marcaje del oligonucleótido *EcoRI*, para una reacción, se llevó a cabo de la siguiente manera: 0.36 μ L del oligonucleótido *EcoRI*, 0.20 μ L del regulador de la T4 cinasa 5X, 0.04 μ L de T4 cinasa y 0.4 μ L γ -ATP³² (3000Ci/mmol, diluído 1:4), posteriormente esta mezcla se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente, se inactivó a 70°C por 10 min.

Para la PCR selectiva, el volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 μL conteniendo para una reacción: 0.5 μL del oligonucleótido marcado [*EcoRI*], 4.5 μL del oligonucleótido [*MseI*], 2 μL del amortiguador 10X PCR+ MgCl_2 [15 mM], 0.1 μL de *Taq* polimerasa [5U/ μL], 7.9 μL de agua grado MilliQ y 5 μL de la preamplificación. La PCR consistió de un ciclo de 5 min a 94°C; 12 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s comenzando en 65°C (disminuyendo cada ciclo 0.7°C), 1 min a 72°C; 23 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 1 min a 72°C.

Los fragmentos derivados de la amplificación selectiva, fueron separados en geles desnaturalizantes de acrilamida al 6%. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara BioRad, Sequi-Gen® GT System (Bio Rad). El gel se corrió en amortiguador TBE 0.5X, pH 8.0, a voltaje constante (1600 V) hasta que el colorante xilen-cianol alcanzó el borde inferior del gel, el marcador de peso molecular que se utilizó fue el 50 bp DNA ladder (Invitrogen). El gel se separó de los vidrios de la cámara de electroforesis y se adhirió a papel filtro Whatman 1MM, seguido de su cobertura con Alusa Plast (plástico) y posterior secado al vacío en un sistema de secado de geles modelo 583, HydroTech™ Gel Drying System (BioRad). Una vez seco, se colocaron cuatro marcas radiactivas, una en cada esquina, como puntos de referencia para permitir la alineación con la autorradiografía, con el fin de identificar y obtener las bandas de interés. Finalmente, se expuso el gel a la placa de radiografía Kodak X-OMAT AR FILM (35x43cm) a -70°C durante 20 h. El análisis de las bandas se realizó en la autorradiografía. Todos los reactivos utilizados fueron de Invitrogen.

Análisis de datos de AFLP

Fueron analizadas las bandas con tamaños entre 100-400 pb, en los diferentes geles. Los marcadores AFLP fueron registrados visualmente, comparados con el marcador de 50 pb DNA Ladder (Invitrogen), manualmente codificadas, y analizadas como datos binarios de presencia (1) o ausencia (0). A partir de estos marcadores AFLP, se estimó la diversidad genética de los aislados de México y Argentina, utilizando el Índice de Shannon (S), asumiendo que cada marcador genotípico representa un locus distinto (Allnutt *et al.* 1999), y la diversidad genética de Nei (h) utilizando frecuencias alélicas (Nei 1973). Adicionalmente, la heterocigocidad esperada por población (H) y la heterocigocidad promedio (Hw) fueron calculadas utilizando frecuencias alélicas de acuerdo al método Bayesiano de Zhivotovsky (Zhivotovsky, 1999). Además, se realizó un análisis de AMOVA usando el programa FMAD v1.1 β software (Schlüter y Harris, 2006) para calcular la partición de varianza molecular de los aislados de *Coccidioides* spp. de México y Argentina a un nivel jerárquico (origen geográfico).

La significancia estadística de *Fst* y la partición de la varianza molecular fueron evaluadas mediante la realización de 10000 permutaciones de datos aleatorios (Excoffier *et al.*, 1992). La similitud genética entre los aislados estudiados fue calculada con el índice de Jaccard. Mientras que, la relación genética entre los aislados fue evaluada por medio del método de UPGMA utilizando la matriz de Jaccard. La distorsión del árbol inferido fue valorada con el coeficiente de correlación cofenético (*CCC_r*), el cual fue calculado usando la prueba de Mantel (Manly, 1997). Un método estadístico multivariado se llevó a cabo utilizando el programa NTSYS-PC program [version 2.0, Exeter software] (Rohlf, 1998). Además, se construyó una red de haplotipos para evaluar la relación genealógica entre los haplotipos AFLP utilizando el método de median-joining implementado en NETWORK 4.2.0.1

[<http://www.fluxus-engineering.com>] (Bandelt *et al.*, 1999), donde las ramas con diferente longitud representan niveles de cambios evolutivos. Los parámetros utilizados fueron $\epsilon = 0$, un peso de 1/1 de transiciones-transversiones, y criterios de conexión. Para distinguir entre estructura clonal y recombinante, se utilizó el índice de asociación (I_A) (Maynard-Smith *et al.* 1993), una prueba estadística que mide el grado de asociación no aleatoria entre alelos en diferentes loci (desequilibrio de ligamiento), implementado en el programa LIAN v 3.5 (Haubold y Hudson, 2000).

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR

Purificación y reamplificación de las bandas seleccionadas a partir de AFLP

Los patrones polimórficos obtenidos por AFLP también fueron analizados para seleccionar bandas diferenciales entre las especies *C. immitis* y *C. posadasii*, y utilizadas para diseñar los marcadores SCARs como se describe a continuación.

La película revelada se alineó con el gel, considerando las marcas radiactivas de referencia, y una vez localizadas las bandas de interés, éstas se cortaron y se transfirieron a tubos de 1.5 ml para ser eluidas con agua MilliQ. Los tubos se calentaron hasta ebullición y los fragmentos correspondientes a las bandas diferenciales, se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto, en presencia de glicógeno (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Los fragmentos de DNA purificados se concentraron al vacío en un AES1010 Speedvac System (ThermoQuest, Holbrook, NY, USA) durante 2 h y se resuspendieron en 30 μL de agua MilliQ. La pureza y concentración del fragmento se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La electroforesis se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas anteriormente y las concentraciones de los fragmentos de DNA se

definieron por comparación con concentraciones conocidas del fago λ (10, 20, 50 y 100 ng/ μ L). Los fragmentos purificados se amplificaron nuevamente, utilizando los oligonucleótidos que los generaron y bajo las mismas condiciones de la PCR, descritas en la sección de AFLP. Al final de la amplificación se adicionaron 1.5 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y se incubó a 70°C por 10 min, con el fin de adicionar una adenina en el extremo terminal 3' de cada uno de los amplicones y favorecer la ligación de los mismos al vector de clonación. Posteriormente, estos productos se purificaron con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), según las indicaciones del fabricante, para después ser clonados y secuenciados.

Clonación de los fragmentos purificados

Los amplicones recuperados y purificados como se describió antes, se concentraron al vacío y se ajustaron a un volumen final de 5 μ L. Se tomó 1 μ L de este volumen y se ligó al vector de clonación pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI), de acuerdo con las indicaciones descritas por la casa comercial. Los productos de la ligación, que incluyen los fragmentos amplificados en el vector pGEM[®]-T Easy, se transformaron en células competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega). Para esto, las células competentes JM109 se descongelaron sobre hielo, se les adicionó 1 μ L del producto de ligación y se incubaron en hielo durante 30 min, luego se dio un choque térmico a 42 °C por 90 s e inmediatamente se regresaron al hielo por 2 min. Se agregaron 900 μ L de medio Luria (Tryptona 1% w/v, extracto de levadura 0.5% w/v, cloruro de sodio 0.5% w/v, pH 7.0) y se incubaron a 37 °C en agitación por 1h. Se centrifugaron las células a 5000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante hasta la décima parte del volumen inicial. La cantidad total (100 μ L) se

sembró en cajas Petri con medio de selección [Luria adicionado de ampicilina 100 µg/mL, Isopropilio-β-D-galactósido (IPTG) 0.1M, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal) 50 mg/mL] y se incubaron a 37 °C por 24 h. Finalmente, se seleccionaron las probables clonas recombinantes (colonias blancas). La caracterización de las colonias recombinantes se realizó por PCR en colonia y posteriormente se llevó a cabo la purificación de los plásmidos.

Caracterización directa de clonas por PCR en colonia

Para revelar la presencia de los insertos y confirmar su tamaño, se tomó una asada de cada una de las clonas recombinantes seleccionadas y se resuspendieron en 500 µL de agua milli-Q. Se calentó hasta ebullición 5 min y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, se tomaron 5 µL del sobrenadante para llevar a cabo una PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo y pUC/M13 derecho (Güssow and Claxon, 1989). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µL conteniendo 5 µL de la suspensión de células, 1.5 mM de MgCl₂, 250 µM de dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleótido y 2.5 U de *Taq* polimerasa en amortiguador 1X. El programa de amplificación consistió de un ciclo de 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 5 min a 55 °C. Finalmente, 5 µL del producto de reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Purificación de plásmidos por método enzimático

De acuerdo con Birnboim y Doly (1979), las clonas seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Luria a 37 °C por 24 h. El cultivo se transfirió a tubos de 1.5 mL y se

centrifugó a 5000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200 µL de solución I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0) y se homogenizó suavemente. Posteriormente, se agregaron 400 µL de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y se mezcló por inversión hasta observar la aparición de hebras de DNA. Se adicionaron 300 µL de solución III (acetato de potasio 5 M 60% V/V, ácido acético glacial 11.5% V/V, agua desionizada 28.5 % V/V) manteniendo en hielo durante 10 min y se centrifugó a 15000 rpm durante 1 min. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -40 °C por 30 min. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se lavó el botón con etanol al 70% y se secó por vacío durante 2 h. El DNA se resuspendió en 20 µL de agua MilliQ. La presencia del plásmido se comprobó por electroforesis en agarosa al 1%. Los plásmidos se conservaron a -20 °C.

Secuenciación

Los fragmentos clonados fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en un aparato ABI (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA) utilizando los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3') y pUC/M13 derecho (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') (Promega). Las secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos clonados se alinearon y compararon con todas las secuencias depositadas en el GenBank, mediante el programa BLAST 2.2.9 (Altschul *et al.*, 1997), para descartar homologías con genes de hongos patógenos relacionados. Con base en este resultado, se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos específicos para *C. immitis* y *C. posadasii* utilizando el programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), considerando los siguientes

parámetros: longitud adecuada de los oligonucleótidos (18 a 25 nucleótidos), el contenido de guanina-citosina debe estar entre 40 a 60%, la temperatura de alineamiento de 57 a 63 °C, 100% de complementaridad a la secuencia molde y no autocomplementarse ni formar estructuras secundarias.

Estandarización de las condiciones para la PCR con el marcador SCAR

Con base en las características de los oligonucleótidos seleccionados, se realizaron curvas de concentración de DNA (5, 10, 15 y 20 ng/μL) y de MgCl₂, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para la amplificación. Inicialmente, se utilizó la mezcla de reacción en un volumen total de 25 μL que consistió de: dNTPs 200 μM, MgCl₂ 2 mM, 100 pmol de cada oligonucleótido y 1U de *Taq* polimerasa, en amortiguador 1X. El programa de amplificación fue: un ciclo a 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 1 min, y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Evaluación de la sensibilidad del marcador SCAR

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectado por PCR con el marcador SCAR antes diseñado, se utilizaron diferentes concentraciones de DNA (5 a 0.009 ng) obtenido de la cepa de referencia de *C. posadasii* (HU-1).

Especificidad del Marcador SCAR

La especificidad del marcador SCAR fue determinada por PCR según las condiciones estandarizadas previamente, utilizando DNA de todos los aislados de *Coccidioides* spp. incluidos en este trabajo. Además, se incluyeron DNAs de otros hongos patógenos (*Aspergillus lentulus*, *A. niger*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, y *Candida albicans*).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Macromorfología

Todos los aislados presentaron la macromorfología típica de la especie. La textura de las colonias, en general, mostró colonias vellosas, con bordes lisos y algunas de aspecto pulverulento. El color del anverso en la mayoría de los aislados fue blanco y algunas presentaron color marrón claro (Figura 1). De manera similar, el reverso en la mayoría de los aislados, también fue de color marrón claro, sin embargo, los aislados 073089, HU-12, M-153 y 083378 mostraron un pigmento de color marrón oscuro (Figura2).

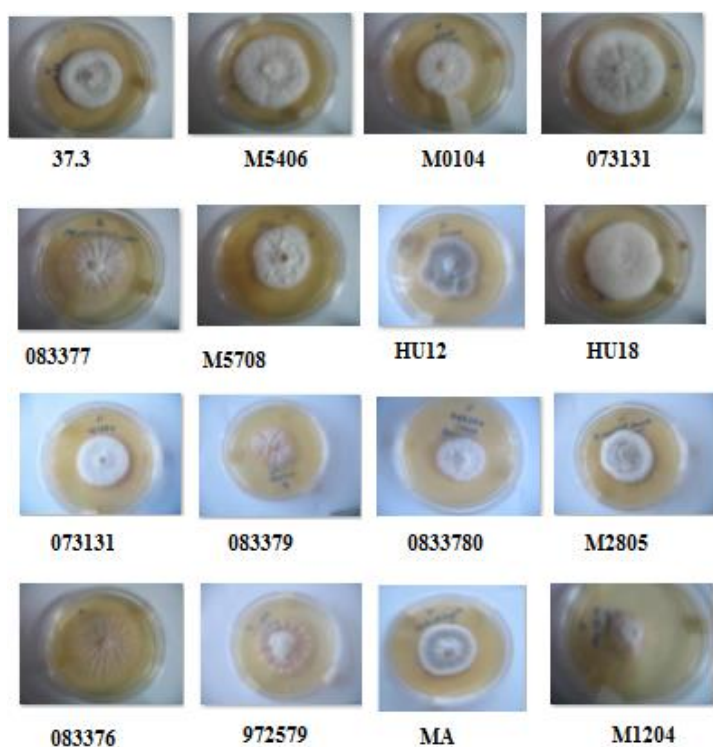


Figura 1. Macromorfología de aislados de *Coccidioides* spp. La textura de las colonias, en general, mostró colonias vellosas, con bordes lisos y algunas de aspecto pulverulento.

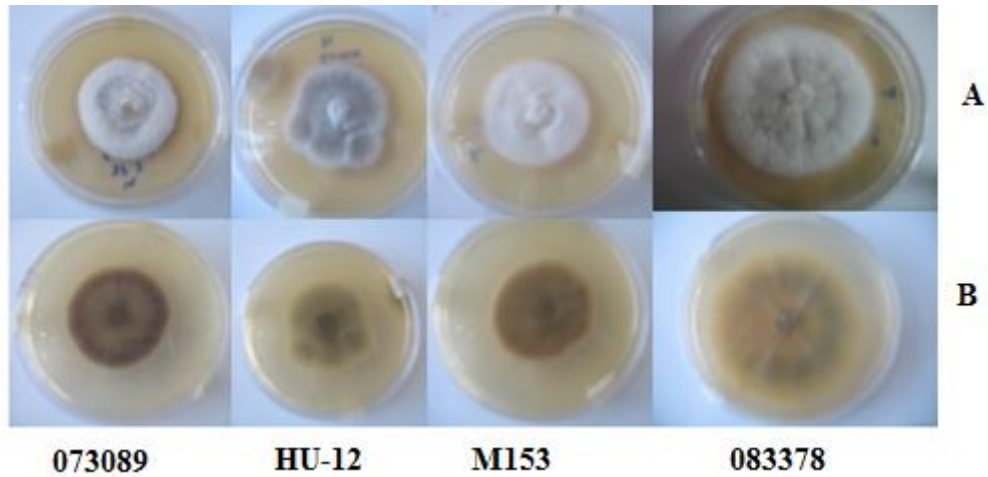


Figura 2. Producción de pigmento en aislados del género *Coccidioides*. M153 (*C. immitis* M153); 073089, HU-12 y 083378 (*C. posadasii*). El anverso (A) mostró colonias vellosas, con bordes lisos y aspecto pulverulento, mientras que el reverso (B), mostró un pigmento de color marrón oscuro.

Obtención de exoantígenos

La identidad antigénica de todos los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* incluidos en este estudio fue corroborada por el método de producción de exoantígenos y en todos los aislados se confirmaron las características antigénicas de la especie por la presencia de una o dos bandas de precipitación (Figura 3). Seis de los exoantígenos probados dieron doble banda de identidad, mientras que el resto de los exoantígenos probados sólo mostraron una banda.

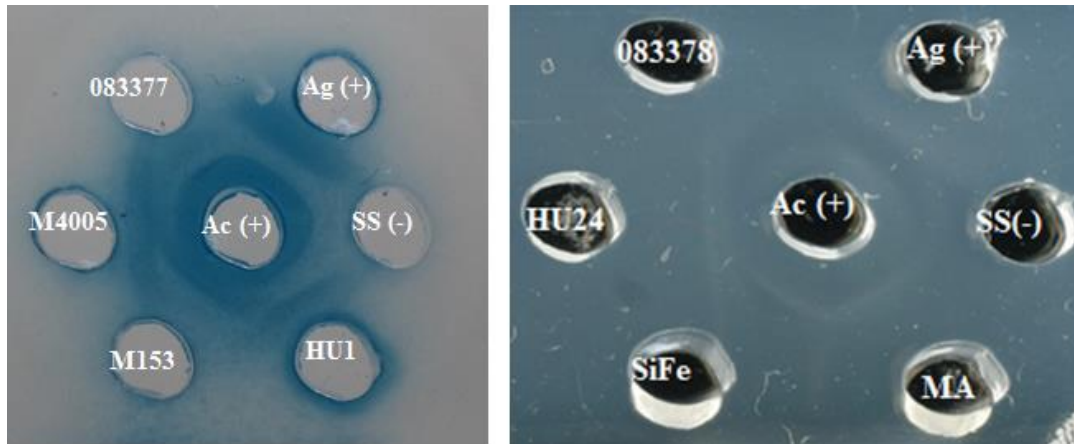


Figura 3. Identificación inmunológica de exoantígenos. La identificación de los exoantígenos (coccidioidinas), con base en la aparición de las bandas de identidad comparadas con el antígeno de referencia a través de la IDG, se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Ag (+): Antígeno de referencia; Ac (+): Suero positivo anti-*Coccidioides*; SS (-): Solución salina. Los nombres de los aislados probados se encuentran inscritos en cada pozo.

Tasa de crecimiento

Los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*, cultivados en medio YEG-agar, conteniendo 4 y 6% de NaCl, mostraron las tasas de crecimiento más bajas con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$), mientras que los aislados crecidos en medio conteniendo 2% de NaCl, no mostraron diferencias estadísticas significativas comparadas con los testigos. Al efectuarse el análisis por país de procedencia, tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de crecimiento de aislados de *C. posadasii* crecidos en diferentes concentraciones de NaCl

Aislados	Tasa de Crecimiento (cm)			
	NaCl (0%)	NaCl (2%)	NaCl (4%)	NaCl (6%)
M01	3.48	3.55	2.28	1.4
M12	3.45	3.11	1.63	0.75
M14	2.83	2.9	1.58	0.66
M15	2.85	2.8	1.93	1.06
M23	2.18	2.15	1.6	1.03
M28	3.01	2.95	2.03	1.23
M30	2.35	2.46	1.31	0.98
M39	3.68	3.4	1.8	1.06
M54	2.91	3.6	2.5	1.13
M57	2.7	3.51	2.23	1.31
HU1	3.58	3.78	2.58	1.3
HU2	3.13	3.91	2.1	1.05
HU11	3.63	3.28	2.23	1.43
HU12	3.56	3.65	2.43	1.13
HU18	3.21	3.15	2	1.16
HU19	2.26	2.6	1.63	0.9
HU24	3.45	3.5	2.06	1.26
SiFe	3.11	3.36	2.2	1.18
37.3	3.5	3.8	2.45	1.48
5256	2.88	2.5	2	2.86

MA	3.45	3.4	2.1	1.01
972579	3.05	3.35	2.11	1.26
073089	3.68	3.48	2.3	1.26
073094	3.53	3.1	2.16	1.1
073129	3.58	3.6	2.13	1.11
073130	2.88	2.86	1.46	0.95
073131	3.73	3.48	2.4	1.36
083376	2.65	2.91	1.61	0.9
083377	3.53	3.25	2.26	2.5
083380	3.16	3.46	1.93	1.28
083382	2.43	3.08	1.78	1.11
083381	3.05	2.96	2.73	1.05

Tamaño de artroconidios

El tamaño de los artroconidios para todos los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* fueron desde 2.54 a 3.37 μm para el ancho y de 4.35 a 8.80 μm para el largo. El aislado HU-12 mostró el tamaño de artroconidios más grandes, los cuales fueron de 8.80 x 2.56 μm (Tabla 3). Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Tabla3. Tamaño de artroconidios de aislados de *Coccidioides* spp.

Aislado	Largo(μm) \pm DE*	Ancho(μm) \pm DE*
M01-04	5.99 \pm 0.65	2.56 \pm 0.0
M12-04	6.23 \pm 1.29	2.56 \pm 0.0
M14-04	6.15 \pm 1.28	2.56 \pm 0.0
M15-04	6.23 \pm 1.29	2.56 \pm 0.0
M23-05	4.91 \pm 0.76	2.56 \pm 0.0
M28-05	4.35 \pm 0.64	2.56 \pm 0.0
M30-05	5.38 \pm 0.78	2.56 \pm 0.0
M39-05	5.93 \pm 1.39	3.19 \pm 0.65
M40-05	6.66 \pm 1.27	2.56 \pm 0.0
M54-06	6.53 \pm 1.27	2.56 \pm 0.0
M57-08	6.66 \pm 1.29	2.56 \pm 0.0
HU-1	5.89 \pm 1.19	2.56 \pm 0.0
HU-2	4.70 \pm 0.61	2.56 \pm 0.0
HU-11	5.38 \pm 0.78	2.56 \pm 0.0
HU-12	8.80 \pm 1.29	2.56 \pm 0.0
HU-18	6.23 \pm 1.29	2.56 \pm 0.0
HU-19	4.70 \pm 0.61	2.56 \pm 0.0
HU-24	4.35 \pm 0.64	2.56 \pm 0.0
M153	5.08 \pm 0.79	2.77 \pm 0.49
37.3	5.81 \pm 1.15	2.56 \pm 0.0
5256	6.66 \pm 1.27	2.56 \pm 0.0

MA	5.55 ± 0.97	2.56± 0.0
SiFe	5.85 ± 1.29	2.82 ± 0.52
972579	6.10 ± 1.33	2.56 ± 0.0
073089	5.55 ± 0.97	2.56 ± 0.0
073094	4.35 ± 0.64	2.56± 0.0
073129	4.61 ± 0.64	2.56 ± 0.0
073130	5.98 ± 1.23	2.60 ± 0.23
073131	5.21 ± 0.47	2.56 ± 0.0
083376	5.59 ± 1.09	3.41 ± 0.61
083377	5.92 ± 1.72	2.77 ± 0.75
083380	5.89 ± 1.20	2.56 ± 0.0
083382	5.46 ± 1.58	3.37 ± 0.63
083381	5.51 ± 0.96	3.07 ± 0.63

*DE: Desviación Estándar

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Extracción de DNA genómico

Se obtuvo el DNA genómico de los 34 aislados de *Coccidioides* spp. incluidos en el estudio (Tabla 1). La integridad y cantidad de DNA fue adecuada para la metodología de AFLP, ya que se requiere DNA puro para que el corte con las enzimas de restricción se lleve a cabo eficazmente. En la figura 4 se observa el análisis electroforético de diferentes DNAs obtenidos de los aislados de *Coccidioides* spp., en el que se aprecian concentraciones

variables que fueron desde 100 hasta 500 ng/2 μ L). Para los ensayos de AFLP, la concentración de los DNAs se ajustó a 500 ng/18 μ L.

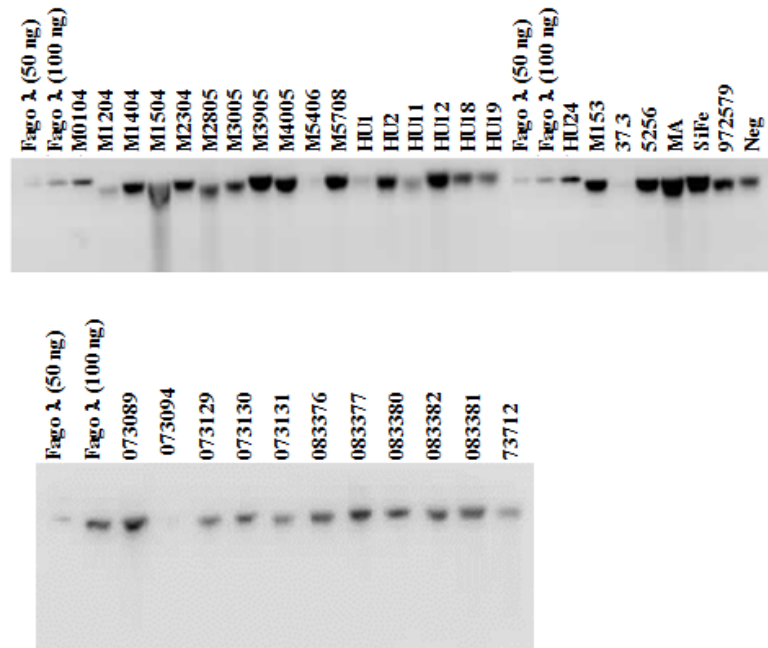


Figura 4. DNA obtenidos de aislados de *Coccidioides* spp. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% y el gel fue teñido con bromuro de etidio. Los dos primeros carriles en cada gel corresponden a concentraciones de 50 y 100 ng de fago λ como como DNA de referencia.

Identificación de especie para los aislados de *Coccidioides* spp.

Los oligonucleótidos utilizados, de acuerdo al método descrito por Umeyama *et al.* (2006), identificaron 31 de los aislados como *C. posadasii*, ya que éstos delimitan una región de 720 pb, mientras que cuatro aislados fueron identificados como *C. immitis* (M0104, M3905, M153 y SiFe), en éstos se obtuvo un amplicón de 634 pb, correspondiente a *C. posadasii*, como se muestra en la Figura 5.

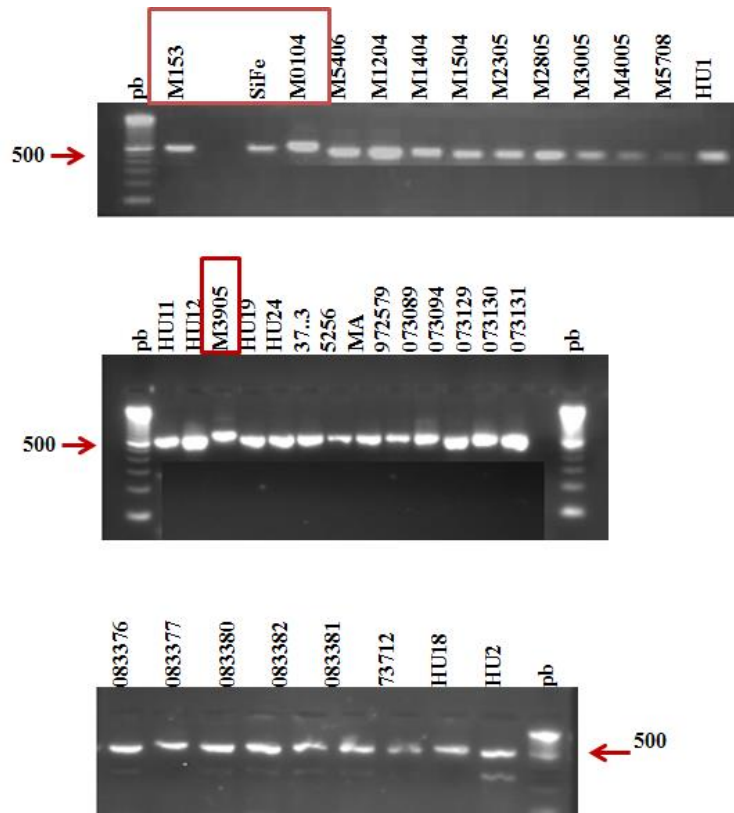


Figura 5. PCR de DNAs de *Coccidioides* spp. de acuerdo al método descrito por Umeyama *et al.* (2006). Los aislados enmarcados en rojo corresponden a los aislados identificados como *C. immitis*. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

Por otro lado, un segundo método empleado para identificar los aislados incluidos en el presente estudio, fue el descrito por Bialek *et al.* (2004), el cual mostró que todos los aislados probados dieron las bandas esperadas, una correspondiente a un amplicón de 526 pb, en la primera PCR (Figura 6), y una banda de 342 pb en la segunda PCR (Figura 7).

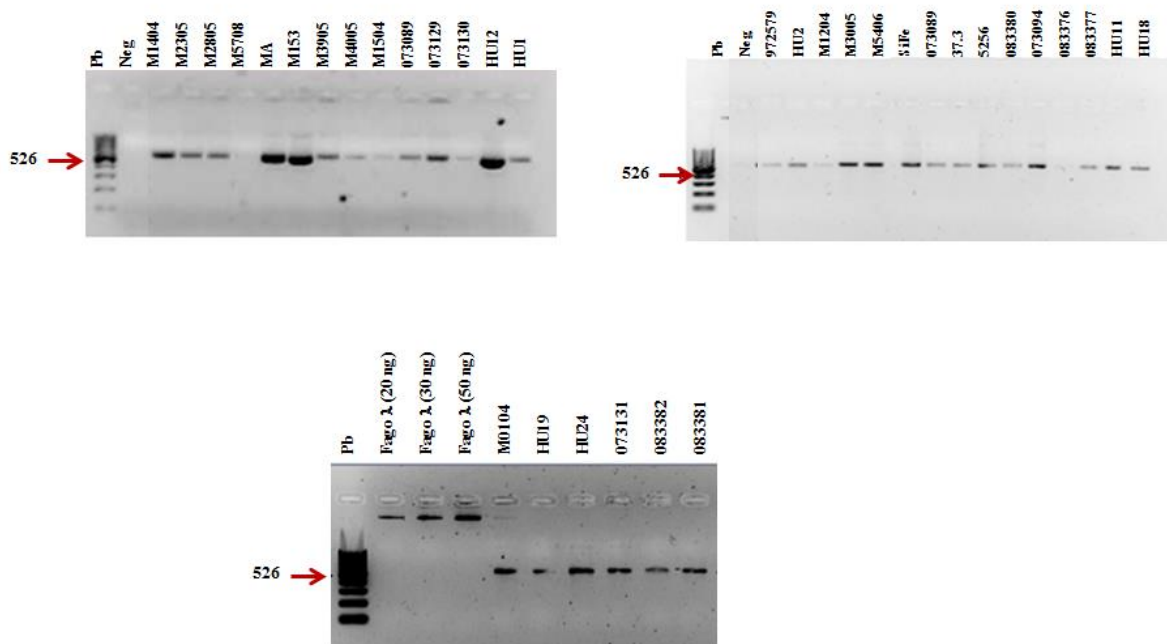


Figura 6. PCR anidada de DNAs de *Coccidioides* spp. de acuerdo al método descrito por Bialek *et al.* (2004). El amplicón de 526 pb fue obtenido en la primera PCR. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

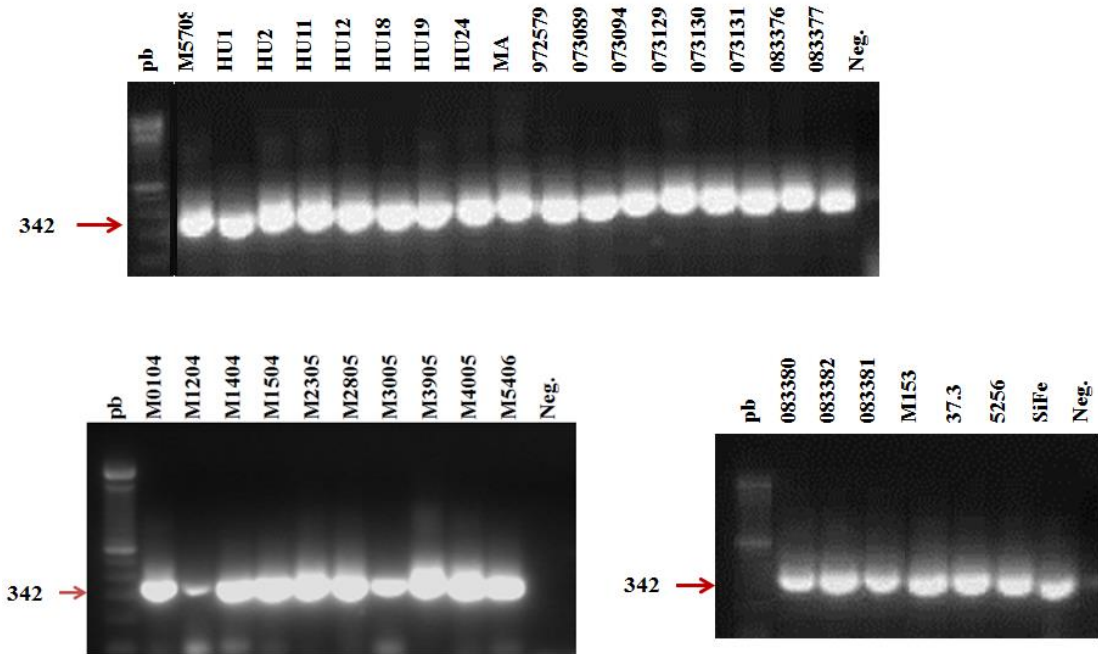


Figura 7. PCR anidada de DNAs de *Coccidioides* spp. de acuerdo al método descrito por Bialek *et al.* (2004). El amplicón de 342 pb fue obtenido en la segunda PCR. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

Por otro lado, el análisis de las secuencias de los amplicones de 526 pb, obtenidos en la primera PCR, de acuerdo a Bialek *et al.* (2004), mostró que 32 de los aislados estudiados, correspondían a la especie *C. posadasii* y dos a *C. immitis* (M4005 y M153), ya que en estas secuencias se encontró una delección de 12 bases, entre las posiciones 996 a 1007, de manera coincidente a lo que describen Canteros *et al.* (2009). Las secuencias obtenidas, correspondientes a *C. posadasii*, fueron registradas en el GenBank con los números de acceso: JQ919960-JQ919967; JQ919969-JQ919977 y JQ919979-JQ919992 (Apéndice 1).

Por último, estos aislados también fueron identificados como *C. posadasii* con una identidad nucleotídica > 99%, a través del análisis de inferencia filogenética (Figura 8).



Figura 8. Identificación de los aislados de *C. posadasii* a través de inferencia filogenética.

La identificación de los aislados utilizados en el presente estudio, se realizó a través de inferencia filogenética comparando las secuencias parciales del gene *Ag2/PARA* obtenidas en el presente estudio, con las secuencias de hongos del GenBank.

AFLP

Es pertinente acalarar, que debido a que sólo dos aislados correspondieron a la especie *C. immitis*, éstas fueron omitidas para realizar la caracterización genotípica y el estudio de estructura de poblaciones, por lo que solo fueron incluidos los aislados correspondientes a la especie *C. posadasii*.

El número de marcadores obtenidos en cada amplificación selectiva del AFLP fue de 32 para la combinación E+AC:M+CTC; 39 para la combinación E+AA:M+CTG; 25 para la

combinación E+AA:M+CTC; 19 para la combinación E+AA:M+CAT; 21 para la combinación E+AC:M+CAT; y 34 para la combinación E+AA:M+CAC dando un total de 170 marcadores (Figuras 9-14).

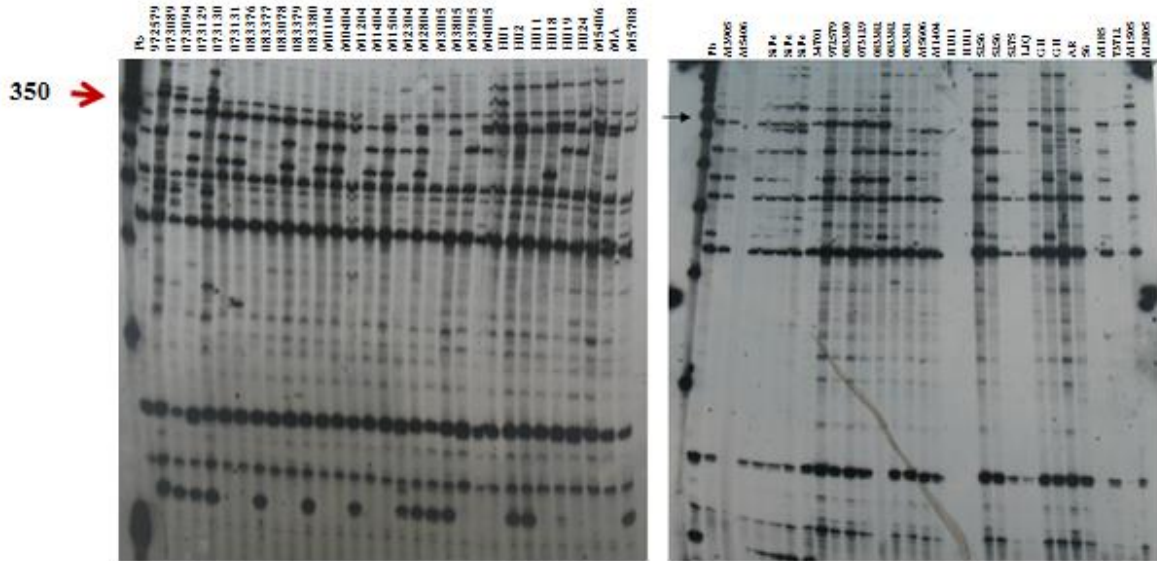


Figura 9. AFLP de aislados de *Coccidioides* spp. La obtención de los patrones polimórficos se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos E-AC/M-CTG y se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos.

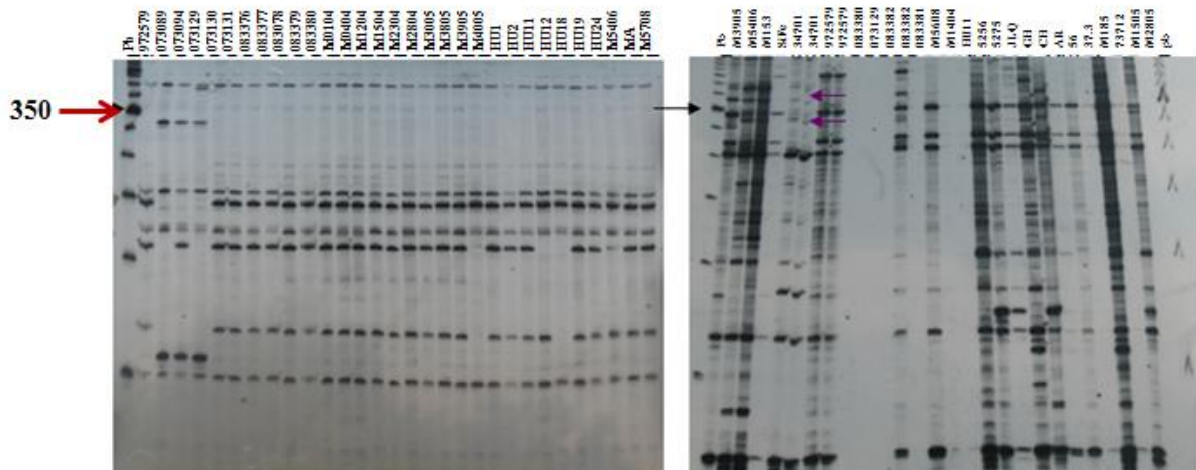


Figura 12. AFLP de aislados de *Coccidioides* spp. La obtención de los patrones polimórficos se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos E-AA/M-CTC. La obtención de los patrones polimórficos se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

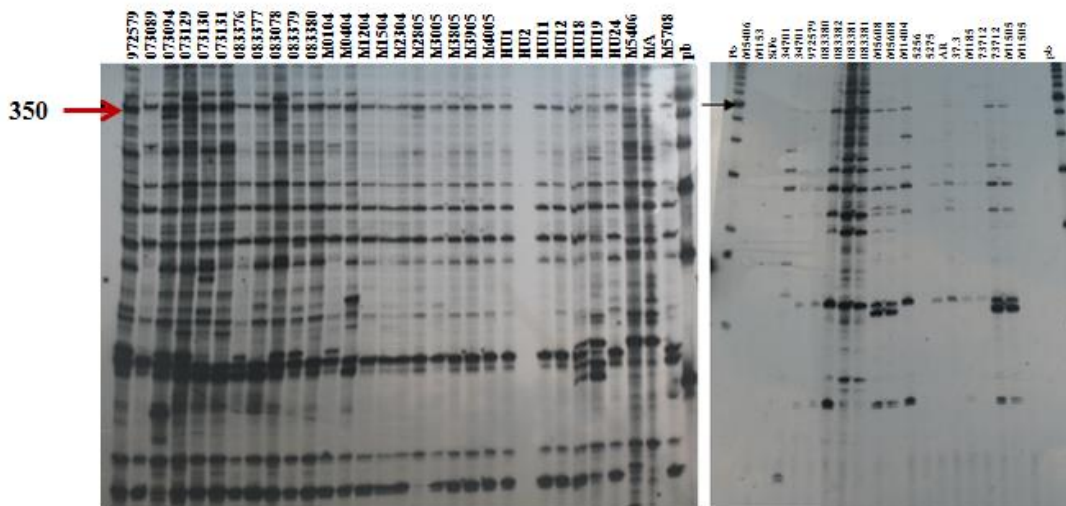


Figura 13. AFLP de aislados de *Coccidioides* spp. La obtención de los patrones polimórficos se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos E-AA/M-CTG. La

obtención de los patrones polimórficos, se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

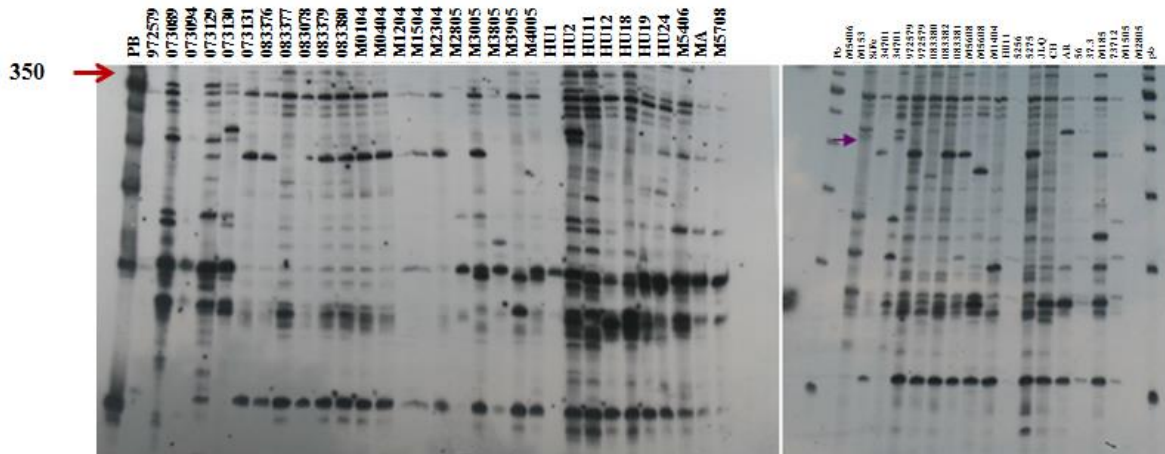


Figura 14. AFLP de aislados de *Coccidioides* spp. La obtención de los patrones polimórficos se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos E-AC/M-CAT. La obtención de los patrones polimórficos se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Análisis de datos AFLP

La utilización de seis combinaciones de oligonucleótidos, generó un total de 170 marcadores AFLP (Apéndice 2), los cuales que fueron utilizados para estimar la variabilidad genética y la estructura de población. En general, los diferentes estimadores de variabilidad genética indicaron que los aislamientos de México y Argentina presentan una gran variabilidad, como lo muestran los valores de los diferentes estimadores de diversidad genética (número efectivo de alelos, así como los valores de diversidad genética estimada por el Índice de Shanon (H') –un estimador no sensible al número de aislamientos analizados-, y la heterocigocidad promedio), como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Estimadores de diversidad genética de poblaciones de *C. posadasii* de México y Argentina

Poblaciones	P(%)	n_e	I	h
<i>C. posadasii</i> (MX)	91.76	1.5970 ± 0.0603	0.5011 ± 0.0382	0.3396 ± 0.0289
<i>C. posadasii</i> (AR)	71.76	1.4754 ± 0.0694	0.3951 ± 0.0503	0.2687 ± 0.0361

P (polimorfismo); n_e (número efectivo de alelos); I (índice de diversidad genética de Shanno); h (heterocigocidad). MX (México); AR (Argentina).

Por otro lado, el análisis de AMOVA mostró que el 95.21% de la varianza molecular se encuentra distribuida dentro de las poblaciones de *C. posadasii* de México y Argentina. Además, los resultados también mostraron una pequeña diferenciación genética entre los aislados de *C. posadasii* de ambos países ($F_{st} = 0.048$, $p = 0.0001$).

El dendrograma construido con los aislados de *C. posadasii* procedentes de México y Argentina evidenció 10 grupos (Figura 15). El primer grupo incluyó dos aislados de México (M0101 y 37.3), con una similitud de 56%. El grupo II incluyó 17 aislados de México y Argentina con una similitud entre ellos de 70% y mostró a su vez dos subgrupos. El subgrupo IIa que incluyó 9 aislados de Argentina (073130, 073131, 083376, 083377, 083380, 073089, 073094, 073129 y 972579) y un aislado clínico de México (M1204) con un 74% de similitud, y el subgrupo IIb que incluyó 7 aislados de México (HU1, HU2, HU11, HU12, HU18, HU19 y HU24), con un 73% de similitud. El grupo III estuvo formado por tres aislados de México (M15, M23 y M28) con un 73% de similitud entre ellos. El grupo IV consistió de un solo aislado de México (MA) con un 62% de

similitud. El grupo V incluyó dos aislados de México (M39 y M54) con un 71% de similitud. El grupo VI consistió de dos aislados, uno de México (M14) y uno de Argentina (083382), con un 70% de similitud. El grupo VII incluyó sólo un aislado de Argentina (083381), con un 63% de similitud con el grupo VI. El grupo VIII incluyó dos aislados de México (M30 y M57), con un 65% de similitud. El grupo IX consistió de un aislado de México (5256), con un 36% de similitud con el grupo anterior. Finalmente, el grupo X incluyó sólo un aislado de México (SiFe), con un 35% de similitud. El coeficiente de correlación cofenética ($CCCr = 0.948$, $p = 0.0004$) sugiere que el dendrograma es una buena representación de las similitudes genéticas entre los aislados.

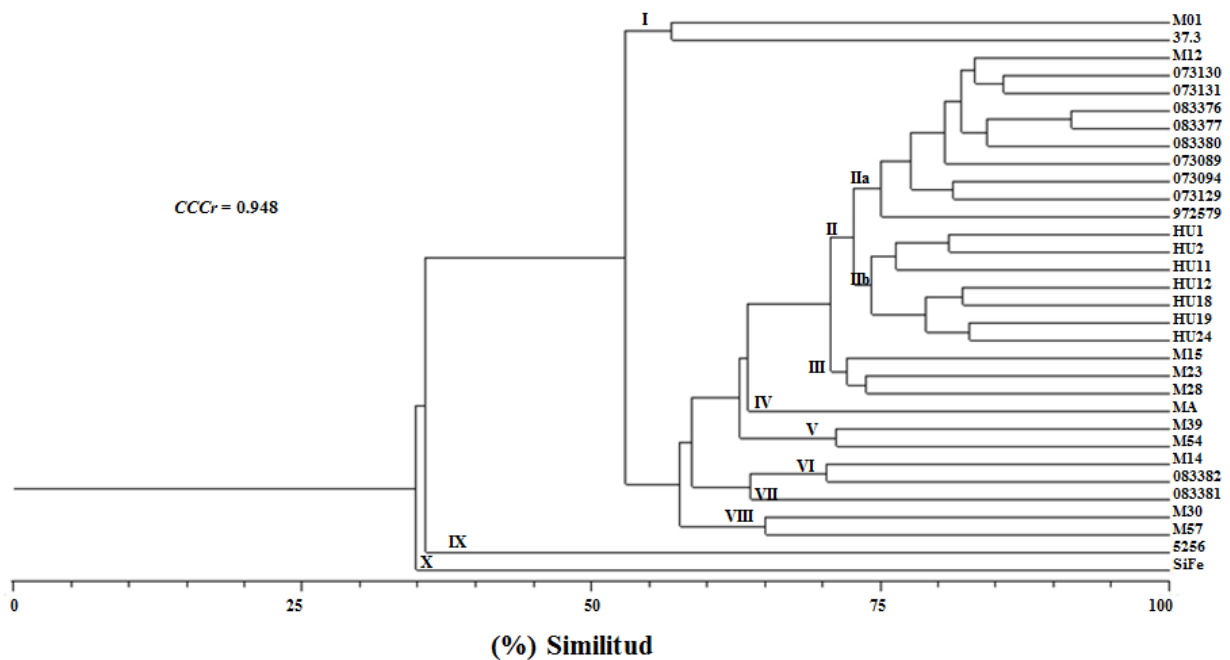


Figura 15. Dendrograma de los aislados de *C. posadasii* de México y Argentina. El dendrograma fue construido con el algoritmo de distancias genéticas pareadas por UPGMA.

La red de haplotipos demostró un gran número de reticulaciones entre los aislados de *C.*

posadasii y una pequeña diferenciación entre los aislados de México y Argentina. Adicionalmente, el número de mutaciones entre cada nodo (1-30) en la red de haplotipos evidenció una amplia variabilidad genética (Figura 16).

Finalmente, el I_A (0.0287) calculado para los aislados en este estudio, sugiere que los aislados tienen un modo de reproducción recombinante.

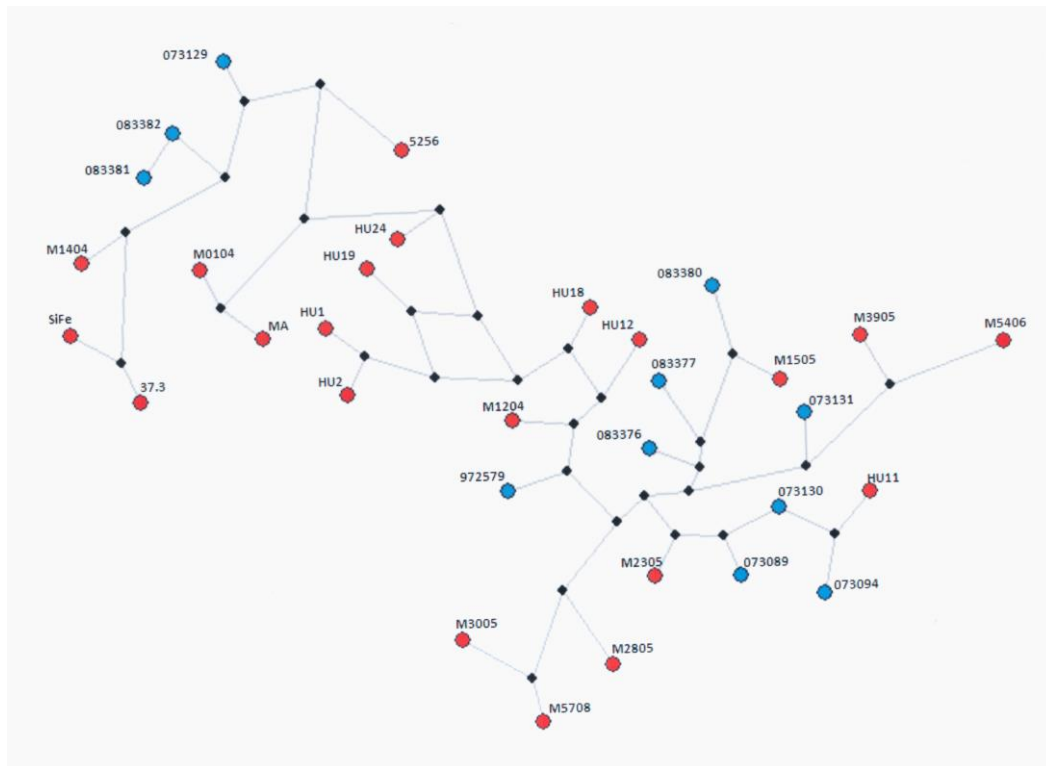


Figura 16. Red de haplotipos para aislados de *C. posadasii* utilizando el método de median-joining. Los círculos rojos corresponden a los aislados de México y los círculos azules corresponden a los aislados de Argentina.

OBTENCIÓN DEL MARCADOR SCAR

Purificación y reamplificación de las bandas seleccionadas obtenidas por AFLP

El análisis de los patrones polimórficos obtenidos por AFLPL con seis combinaciones de oligonucleótidos selectivos, permitió identificar bandas diferenciales como se describe a continuación. Cuatro bandas diferenciales para *C. posadasii*: una banda de 250 pb obtenida con la combinación E-AA/M-CTC; dos bandas de 150 pb y 300 pb, obtenidas con la combinación E-AC/M-CAT; y una banda de 180 pb, obtenida con la combinación E-AA/M-CAT. Mientras que la única banda diferencial para *C. immitis* de 200 pb, fue obtenida con la combinación E-AA/M-CAT. Todas las bandas fueron reamplificadas bajo las mismas condiciones que las generaron (Figura 17).

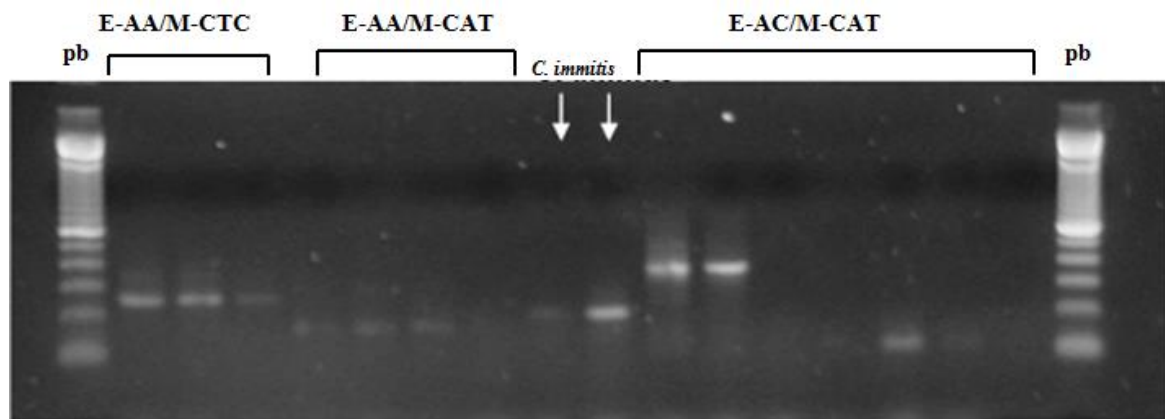


Figura 17. Reamplificación de las bandas diferenciales seleccionadas de los patrones polimórficos obtenidos por AFLP. Las bandas fueron reamplificadas bajo las mismas condiciones que las generaron. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

Después de reamplificar las bandas seleccionadas, se eligieron solo dos bandas, la de 300 bp, obtenida con la combinación E-AC/M-CAT y la de 250 bp obtenida con la combinación E-AA/M-CTC, las cuales se ligaron al vector de clonación pGEM®-T Easy vector

(Promega) y transformadas en células competentes de *E. coli* JM109, observando una eficiencia de transformación del 90%.

Clonación de los fragmentos purificados

Los fragmentos reamplificados: el de 300 bp seleccionado del patrón polimórfico de AFLP con la combinación E-AC/M-CAT, y el de 250 bp seleccionado del patrón polimórfico de AFLP con la combinación E-AA/M-CTC, fueron ligados de manera independiente al vector de clonación pGEM®-T Easy vector (Promega) y transformados en células competentes de *E. coli* JM109. La selección de las clonas recombinantes se hizo con base en el color de las colonias en medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal, en donde las clonas recombinantes presentan color blanco debido a que la secuencia del gen que codifica para la β -galactosidasa se interrumpe al integrar un fragmento de DNA y las células pierden la capacidad de degradar la X-Gal presente en el medio. Las clonas que desarrolla una pigmentación azul no tienen ningún fragmento integrado, por lo que conservan intacta la secuencia del gen de la β -galactosidasa y por lo tanto conservan su capacidad para degradar la X-Gal presente en el medio (Figura 18).

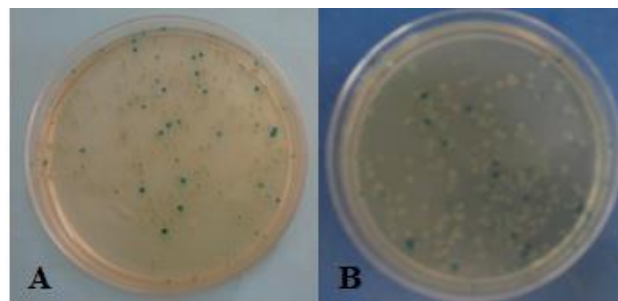


Figura 18. Clonas recombinantes obtenidas en medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. Las colonias blancas corresponden a las clonas positivas (plásmido conteniendo los insertos de 250 (A) y 300 bp (B), como se describe en materiales y métodos.

Las clonas seleccionadas fueron denominadas de la siguiente manera: Primero se anotó la combinación de bases que se utilizaron para generar los patrones polimórficos de AFLP, posteriormente como subíndice, el tamaño del fragmento, de manera que fueron denominados E-AC/M-CAT₃₀₀ y E-AA/M-CTC₂₅₀.

Caracterización directa de clonas por medio de PCR en colonia

Para comprobar que las clonas seleccionadas, contenían las bandas purificadas de 250 y 300 pb, se llevó a cabo una PCR en colonia con los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo y derecho, como se describió en materiales y métodos. Los resultados de la PCR confirmaron las clonas positivas que contenían los fragmentos deseados (Figura 19). Cabe mencionar que el tamaño observado en la figura es ligeramente mayor al observado en la reamplificación, debido a que se amplifica tanto el fragmento integrado como una parte del vector, que es de aproximadamente de 250 bp, lo cual incrementa el tamaño de los fragmentos clonados.

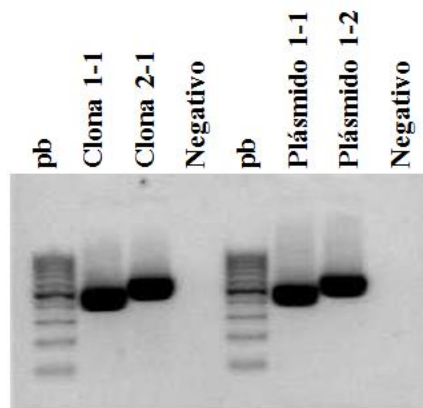


Figura 19. Caracterización de clonas recombinantes a través de PCR en colonia. Se utilizaron oligonucleótidos universales. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

Purificación de plásmidos por método enzimático

De las clonas caracterizadas como positivas para los fragmentos de interés, se purificaron sus plásmidos por el método enzimático como se encuentra especificado en la metodología. Los plásmidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, observando una banda que se encuentra arriba de los 3015 bp, que es el tamaño del vector de clonación (Figura 20). El vector, purificado de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989), y cortado con la enzima de restricción *EcoRI* (Invitrogen) para liberar el inserto de DNA, fue evidenciado por electroforesis en agarosa al 1% (Figura 21).

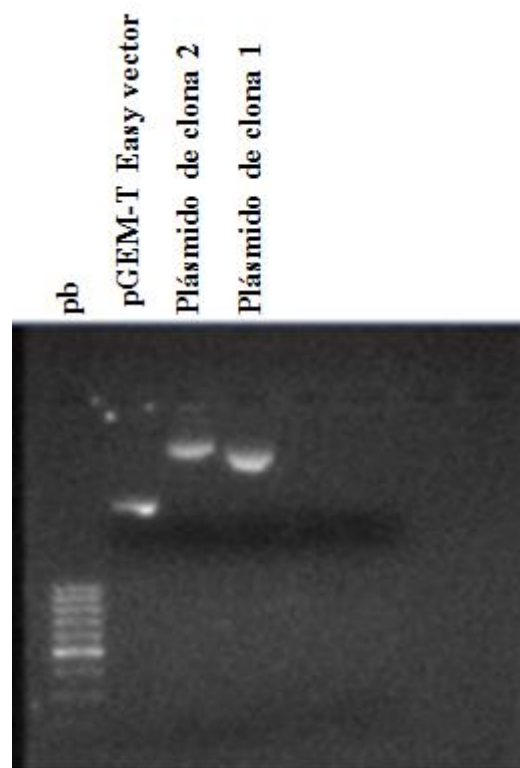


Figura 20. Plásmidos obtenidos por método enzimático. Los plásmidos fueron recuperados como se describe en materiales y métodos. M: λ /HindIII digerido con la enzima *EcoRI*. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

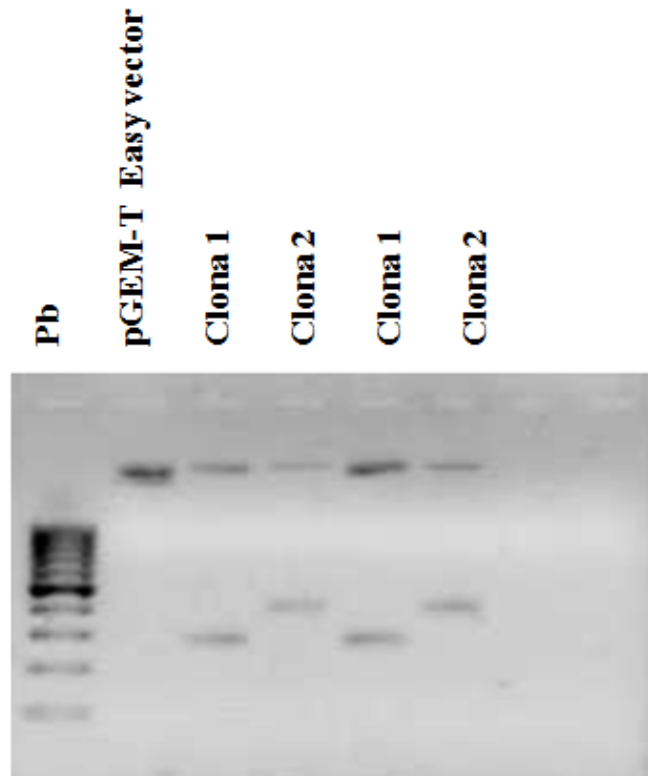


Figura 21. Liberación del vector de clonación y de fragmentos ligados. La liberación de los fragmentos ligados al vector de clonación, se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio.

El resto de las bandas diferenciales detectadas por AFLP con un tamaño ≤ 200 bp fueron reamplificadas y purificadas para su secuenciación directa, ya que debido a su pequeño tamaño resulta difícil su clonación, sin embargo, éstas no fueron probadas en el presente estudio.

Secuenciación

Los fragmentos de 250 y 300 pb, ahora denominados como E-AC:M-CAT₃₀₀ y E-AA:M-CTC₂₅₀, fueron enviados para secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, utilizando los oligonucleótidos universales pUC/M13 izquierdo y derecho (Promega). Las secuencias obtenidas fueron las siguientes, en donde la secuencia marcada en verde corresponde a la secuencia del vector de clonación.

> E-AA/M-CTC₂₅₀

NNNNNACNNNNGCNNNTGATTGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGT
CGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTAAC
TCACAACAAAGTTTTTGGCTTCTTAGGGAGGGAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAANGGNNTTCCNGGCNACCAACCANGGGGNCCTGTGAGGNCGGTGNA
TCNCCCCNCNANCCCCCAANACAANCAAANNTGGANNTGATTTCTGTGNACCCCGTG
CTTNGGGCGNAAAGGGNTAGGNTTCNTGGNTACCGCCTTTCNNAGGGATTTNCNCAGG
ACTCNNCANTCNCTATTGATTTCCCGNCCNCCTGCNNNTCANCCATATGGNAAANCTCC
CANCNCTTTGNANNCNTACCTTGATTATTCTATANTGTCCCCTAAATACCTTGNCNTAN
TCNNGGTCNTACCTGTTTCNNGN

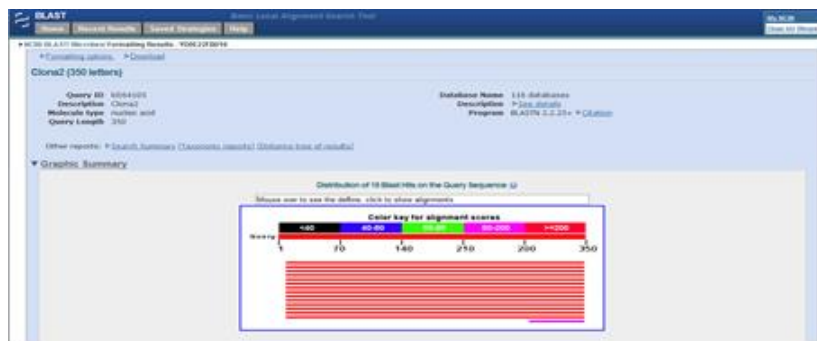
> E-AC/M-CAT₃₀₀

GNGNACGACGGCCNGTGATTGTANACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTC
GCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTGACTGCGTACCAATTCAC
GGCAGGGAGTTATGGAGATATACAAAATGGCGTTAAGTGGGTCTTCTGCGAATGGAAT
CATTGCGCTAAACGGAATGGCGATGACGCTATCTTGGGGACTGTTGTTGTGTACACCA
GTGAATCGACGCTGGCCGAATTCGTTCCACAGTGAAGGAGGCGCGTCCTATGGGTGG
AGGAATCTCCTCAGCGGTCATCTCCCCTTCTGCCGGGGAGTATTCGACCATCGTTCAAG
GCCTGATTTTACTGGGAATCAAGCAATTACGTAGCCAGGGGGCCAGTGCGGTGGTTCT

GGATTGTGTAAGTGGCTTATTCTTTTGCCTTTTGCATGTTACTCAGGACTCATCAATCAC
 TAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGA
 TGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGNNAAA
 CNTGTTTCCTGA

Comparación en el GenBank

Se eligió la secuencia del fragmento correspondientes al marcador E-AC/M-CAT₃₀₀ y se alineó con todas las secuencias depositadas en el GenBank, con la finalidad de determinar que las secuencias sólo correspondieran a hongos del género *Coccidioides* (Figuras 22A y B).



A

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: [UniProt](#) [EMBL](#) [Gene](#) [BioRxiv](#) [Map Viewer](#) [PubChem Bioassay](#)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB012022.1	Coccidioides posadasii CP 0909 cont1.226, whole genome shotgun	522	625	97%	3e-176	99%	
AF262000.1	Coccidioides posadasii CP28 delta S00ap genome, 116649351791, +	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091023.1	Coccidioides posadasii CPA 0965 cont1.2274, whole genome shotgun	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091024.1	Coccidioides posadasii CPA 0909 cont1.2093, whole genome shotgun	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091025.1	Coccidioides posadasii RM5CC 1038 cont1.2353, whole genome shot	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091026.1	Coccidioides posadasii RM5CC 1037 cont1.2433, whole genome shot	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091027.1	Coccidioides posadasii RM5CC 3700 cont1.1680, whole genome shot	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091028.1	Coccidioides posadasii CPA 0901 cont1.2479, whole genome shotgun	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091029.1	Coccidioides posadasii RM5CC 1333 cont1.585, whole genome shotp	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091030.1	Coccidioides posadasii RM5CC 3488 cont1.176, whole genome shotp	522	625	97%	3e-176	99%	
BE091031.1	Coccidioides immitis 85 cont1.7, whole genome shotgun sequence	522	617	97%	1e-174	99%	
BE091032.1	Coccidioides immitis HD26.4 cont1.2284, whole genome shotgun seq	522	617	97%	1e-174	99%	
BE091033.1	Coccidioides immitis RM5CC 1793 cont1.378, whole genome shotgun	522	612	97%	7e-173	99%	
AF151001.1	Coccidioides immitis RM5CC 2394 cont1.248, whole genome shotgun	522	611	97%	7e-173	99%	
BE091034.1	Coccidioides posadasii CPA 0901 cont1.4616, whole genome shotgun	522	611	97%	2e-172	99%	

B

Figura 22. Comparación en el GenBank de la secuencia obtenida para el marcador E-AC/M-CAT₃₀₀ con todas las secuencias de hongos depositadas hasta el momento (A y B).

Diseño de oligonucleótidos específicos para *Coccidioides*

Con base en la secuencia del fragmento E-AC/M-CAT₃₀₀, y utilizando el programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), se diseñaron oligonucleótidos específicos, considerando los parámetros enlistados anteriormente en Materiales y Métodos. Se obtuvieron siete pares de oligonucleótidos, los cuales se enumeran a continuación, donde “Len” se refiere a la longitud del oligonucleótido y “Tm” indica la temperatura de melting.

1. 42 AATGGCGTTAAGTGGGTC 326 AAGCCACTTACACAATCCAG
Len=18 Tm= 55.9°C Len=20 Tm= 55.3°C

2. 43 ATGGCGTTAAGTGGGTCT 326 AAGCCACTTACACAATCCAG
Len=18 Tm= 55.5°C Len=20 Tm= 55.3°C

3. 48 GTTAAGTGGGTCTTCTGCG 326 AAGCCACTTACACAATCCAG
Len=19 Tm= 55.9°C Len=20 Tm= 55.3°C

4. 50 TAAGTGGGTCTTCTGCGA 326 AAGCCACTTACACAATCCAG
Len=18 Tm= 55.3°C Len=20 Tm= 55.3°C

5. 51 AAGTGGGTCTTCTGCGAA 326 AAGCCACTTACACAATCCAG
Len=18 Tm= 56.8°C Len=20 Tm= 55.3°C

6. 113 GGA CTGTTGTTGTGTACACCA 326 AAGCCACTTACACAATCCAG
Len=21 Tm= 56.9°C Len=20 Tm= 55.3°C

7. 17 GGCAGGGAGTTATGGAGA 325 AGCCACTTACACAATCCAGA

Len=18 Tm= 56.0°C

Len=20 Tm= 55.8°C

De éstos, se seleccionó el primer par de oligonucleótidos, que fueron denominados como marcadores SCAR: E-AC/M-CAT(F)₃₀₀ 5'-AATGGCGTTAAGTGGGTC-3' y E-AC/M-CAT(R)₃₀₀ 5'-AAGCCACTTACACAATCCAG-3', que satisfacían los parámetros considerados para su diseño, como se mencionó anteriormente, éstos fueron sintetizado por Sigma-Aldrich Corp.

Estandarización de las condiciones para la PCR con el marcador SCAR E-AC/M-CAT₃₀₀

Para la estandarización de la PCR, se realizaron curvas de concentración de DNA (5, 10, 15 y 20 ng/μL) y la concentración óptima fue de 10 ng de DNA (Figura 23). Las condiciones óptimas para la PCR fueron: mezcla de reacción (25 μL) que consistió en dNTPs 200 μM, MgCl₂ 2 mM, 100 pmol de cada oligonucleótido E-AC/M-CAT(F)₃₀₀ y E-AC/M-CAT(R)₃₀₀ y 1U de *Taq* polimerasa en amortiguador 1X. El programa de amplificación fue: un ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 1 min y un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. La PCR dio la banda esperada de 300 pb con todos los DNAs obtenidos de aislados de *Coccidioides* (Figura 24).

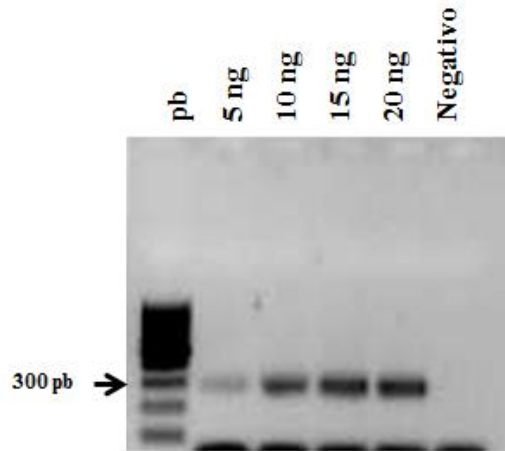


Figura 23. Curva de concentración de DNA para PCR.. Se llevó a cabo una curva de concentración de DNA para la estandarización de las condiciones óptimas para la PCR con los oligonucleótidos E-AC/M-CAT(F)₃₀₀ y E-AC/M-CAT(R)₃₀₀. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

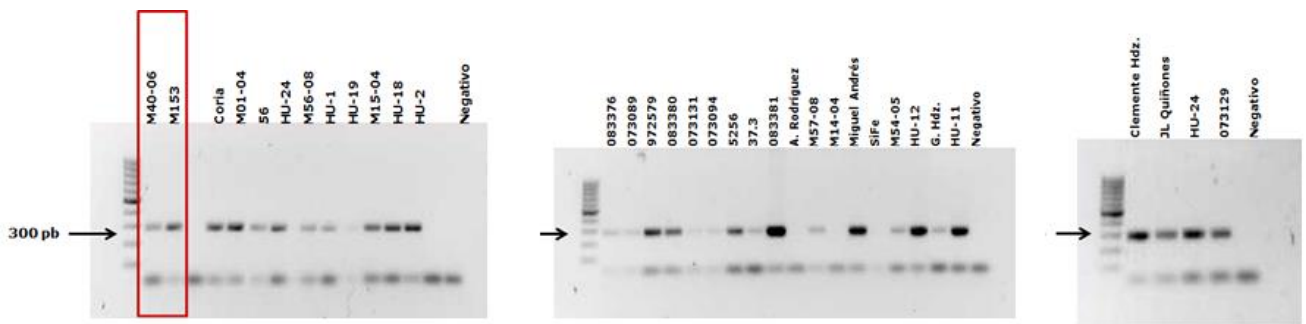


Figura 24. PCR con el marcador SCAR E-AC/M-CAT₃₀₀. Todos los DNAs obtenidos de aislados de *Coccidioides* dieron la banda esperada de 300 pb. Los aislados enmarcados en rojo corresponden a aislados de la especie *C. immitis*. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

Sensibilidad del marcador SCAR

La sensibilidad del marcador E-AC/M-CAT₃₀₀, determinada por PCR, mostró una buena sensibilidad, alcanzando 0.3125 ng/μl de DNA (Figura 25).

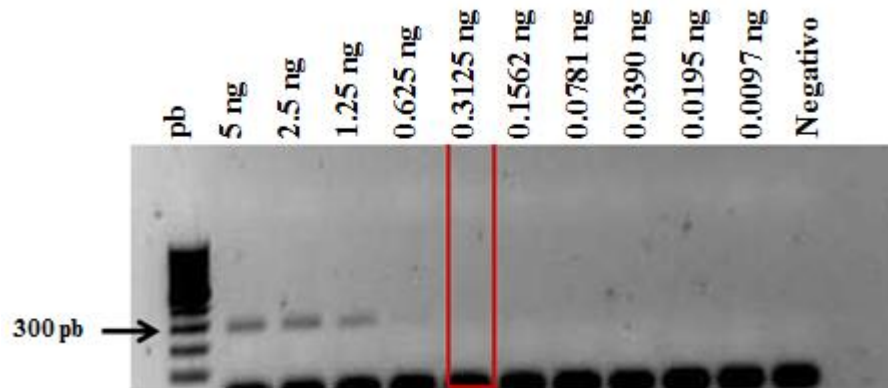


Figura 25. Curva de sensibilidad del marcador SCAR E-AC/M-CAT₃₀₀. La curva se realizó con diluciones de DNA obtenido de la cepa de referencia (HU1). La línea enmarcada en rojo indica la concentración mínima de detección en la PCR. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio, como se describe en materiales y métodos.

Especificidad del marcador E-AC/M-CAT₃₀₀

El marcador E-AC/M-CAT₃₀₀ amplificó todos los DNAs de *Coccidioides* probados, y mostró el producto esperado de 300 pb. Mientras que, los DNAs obtenidos de otros hongos patógenos no mostraron amplificación (Figura 26).

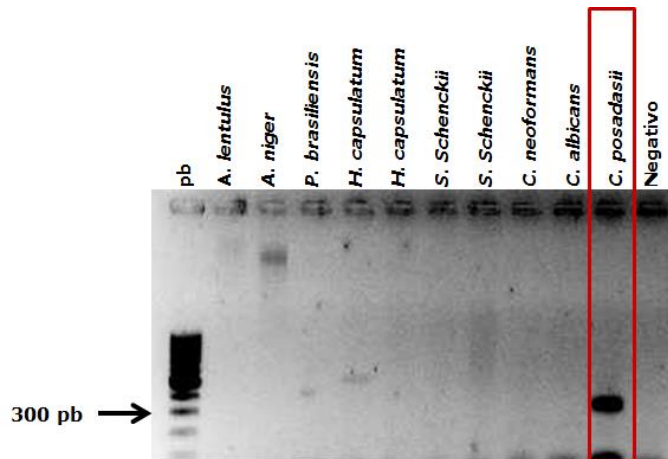


Figura 26. Especificidad del marcador SCAR E-AC/M-CAT₃₀₀. La determinación de la especificidad del marcador SCAR se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, utilizando DNAs de otros hongos patógenos. La línea enmarcada con rojo indica que sólo *C. posadasii* amplificó la banda de 300 pb. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con bromuro de etidio.

DISCUSIÓN

La expansión de la coccidioidomicosis durante los últimos años en zonas endémicas de México y Argentina, es motivo de preocupación ya que son escasos los trabajos que advierten esta situación, por lo que el objetivo del presente estudio fue estudiar diversos aspectos de la biología del hongo, entre éstos su variabilidad fenotípica y genotípica, la estructura de poblaciones de aislados de *Coccidioides* spp. obtenidos en México y Argentina y por otro lado, la obtención de un marcador SCAR, que pueda ser útil en el diagnóstico de esta enfermedad.

Dado que los aislados utilizados en el presente estudio solo se encontraban identificados a nivel de género, para realizar la identificación de especie, se eligieron las sondas previamente descritas por Umeyama *et al.* (2006) y Bialek *et al.* (2004), ya que éstas han sido utilizadas en diversos estudios (Cordeiro *et al.*, 2007; Canteros *et al.*, 2009; Canteros *et al.*, 2010; Cordeiro *et al.*, 2010). Sin embargo los resultados obtenidos fueron poco consistentes, ya que la sonda de Umeyama *et al.* (2006) identificó cuatro aislados como *C. immitis*, mientras que la sonda de Bialek *et al.* (2004) identificó como *C. immitis*, sólo a dos aislados (M40 y M153), después del análisis de la secuencias de los amplicones de 526 pb. Estos resultados indican que las secuencias parciales del gene *Ag2/PRA* de los aislados *Coccidioides* spp., obtenidas con la sonda de Bialek *et al.* (2004), es un método útil para identificar *C. posadasii* de diferentes orígenes geográficos. Además, este fragmento también puede ser usado para identificar *C. immitis* porque esta especie presenta en esta región una delección de 12 bases (Canteros *et al.*, 2009).

Los resultados de la caracterización fenotípica (características macro y micromorfológicas, tasa de crecimiento con diferentes concentraciones de NaCl, tamaño de artroconidios y

producción de exoantígenos) fueron insuficientes para encontrar diferencias entre las especies *C. posadasii* y *C. immitis*, lo que sustenta la afirmación de que estas especies presentan un alto grado de homogeneidad fenotípica.

Por otro lado, para evaluar la variabilidad genotípica de los aislados, se utilizó el AFLP, un método que a pesar de no haber sido utilizado antes para el estudio de *Coccidoides* spp., fue una herramienta útil para identificar variabilidad genotípica, sin embargo sólo se eligieron los aislados pertenecientes a la especie *C. posadasii*, ya que el número de aislados de *C. immitis* era muy reducido para incluirlos en el análisis de variabilidad genotípica y estructura de poblaciones.

Así, la diversidad genética de los aislados de *C. posadasii* de México y Argentina mostraron una alta variabilidad a través de los patrones polimórficos obtenidos por AFLP. Sin embargo, el análisis de AMOVA indicó que esta variación no está estructurada geográficamente. Además, los resultados de este estudio indicaron altas tasas de flujo genético entre los aislados de México y Argentina, lo que revela la escasa diferenciación entre ellos. Una probable explicación de estos resultados puede ser el flujo constante de genes entre estas poblaciones favorecido por la diseminación del hongo a través del aire, ya que las hifas o fragmentos de ésta, que constituyen la fase saprobia e infectante, aún con pequeñas corrientes de aire, liberan fácilmente los arthroconidios y pueden viajar grandes distancias (Pappagianis y Einstein, 1978). Asimismo, la viabilidad de los conidios en el medio ambiente se ve favorecida por la tolerancia del hongo a altas temperaturas (50°C) y su resistencia a la luz UV (debido a su contenido de melanina) que contribuye a su supervivencia y longevidad. Otra explicación es que, quizá el elevado flujo de genes es una consecuencia del movimiento constante de personas en todo el continente o debido a la migración de mamíferos (Fisher *et al.*, 2001), entre los que se encuentran especies

particulares de murciélagos que son migratorios de largas distancias. Esta hipótesis está apoyada por los recientes hallazgos de Cordeiro *et al.* (2012), quienes demostraron la infección por *Coccidioides* spp. en estos mamíferos.

La no-asociación entre aislados de *C. posadasii* de México y Argentina con su origen geográfico, fue apoyada por el dendrograma y la red de haplotipos, que confirmaron la escasa diferenciación genética observada entre ellos. Estos resultados coinciden parcialmente con Fisher *et al.* (2001), quienes encontraron poca variabilidad entre aislados de *Coccidioides* spp. y poca diferenciación genética entre aislados de Sudamérica y de los Estados Unidos.

La técnica utilizada en este estudio fue el AFLP, una herramienta útil para el establecimiento de los cambios en el genoma de los aislados fúngicos, permitiendo al mismo tiempo el análisis de muchos loci y la detección de un gran número de marcadores de DNA polimórficos que cualquier otro método basado en la PCR. Sin embargo, un factor limitante en este estudio fue la imposibilidad de comparar los resultados con otros estudios sobre la estructura de poblaciones de *Coccidioides* spp. debido a la utilización de diferentes metodologías. Por lo tanto, es recomendable que en futuros estudios sean utilizados marcadores que hayan sido validados y utilizados por otros autores en estudios de variabilidad genética de *Coccidioides* spp. con el fin de comparar los resultados obtenidos con cepas de diferentes regiones geográficas.

Por otro lado, la alta variabilidad genética encontrada entre los aislados estudiados tal vez pueda ser explicado por un sistema reproductivo sexual recombinante ($I_A = 0,0287$), como ha sido sugerido por otros autores (Burt *et al.*, 1996, 1997; Fisher *et al.*, 2000, 2002; Fraser *et al.*, 2007; Koufopanou *et al.*, 1997, 1998; Mandel *et al.*, 2007). Este modo de reproducción también ha sido apoyado por la presencia de los loci MAT, potencialmente

funcionales MAT1-2 (HMG) y MAT1-1 (caja-alfa) (Fraser *et al.*, 2007; Mandel *et al.*, 2007) en estos hongos. Por lo tanto, a pesar de que la fase sexual de esta especie aun no ha sido descrita, con base en su alta variabilidad, los estudios indican que, estos hongos recombinan, lo que les proporciona ventajas como la adaptación a nuevos ambientes; de esta manera podrían surgir cepas virulentas o resistentes, que también pueden explicar los numerosos brotes epidémicos recientes.

La alta variabilidad observada también puede explicarse por la posibilidad de que los diferentes genotipos podrían adaptarse a otros ambientes bajo condiciones de desarrollo poco habituales, como pudo haber ocurrido en caso del aislado "MA", que se obtuvo de un paciente originario del estado de Campeche, situado en la región del sureste del México, quien afirmó nunca haber salido del estado. Es pertinente mencionar que esta región tiene condiciones climáticas diferentes de las condiciones descritas como óptimas para el crecimiento de estos hongos. Del mismo modo, la adaptación a nuevos entornos facilita la aparición de cepas hipervirulentas, como lo sugiere Fisher *et al.* (2002) y Jewell *et al.* (2008).

La variabilidad de *Coccidioides* spp. también ha sido investigada en trabajos recientes, para determinar la distribución de genotipos entre las poblaciones, monitorear los brotes epidémicos, evaluar las variaciones en la virulencia y predecir la progresión de la enfermedad (Jewell *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2007; Mandel *et al.*, 2007). Varias líneas de investigación que se refieren a este tema se encuentran en progreso, lo que ampliará la comprensión de la biología de estos patógenos y su interacción con otras especies vivas.

Respecto a la obtención de marcadores SCAR en el presente trabajo, diversos marcadores moleculares para la identificación de *Coccidioides* spp. con fines diagnósticos y epidemiológicos han sido reportados por varios autores (Greene *et al.*, 2000; Fisher *et al.*,

2002; Bialek *et al.*, 2004; Umeyama *et al.*, 2006; Tintelnot *et al.*, 2007; Binnicker *et al.*, 2007). Sin embargo, muchos de estos marcadores tienen baja sensibilidad y especificidad, así como una pobre reproducibilidad, o no se obtienen resultados comparables entre ellos, como sucedió en el presente trabajo, ya que obtuvimos resultados inconsistentes al utilizar las sondas descritas por Bialek *et al.* (2004) y Umeyama *et al.* (2006). Algunos de estos marcadores presentan diferentes tipos de limitaciones asociadas con metodologías complicadas que implican altos costos. Un pequeño número de marcadores han sido obtenidos de genes ribosomales, los cuales son naturalmente conservados dentro del reino de los hongos que pueden llevar a resultados no específicos entre varias especies de hongos (Haynes *et al.*, 1995; Sandhu *et al.*, 1995; Lindsley *et al.*, 2001; Martagon Villamil, *et al.*, 2003). Por otro lado, las sondas comercialmente disponibles utilizadas para pruebas diagnósticas, en algunos casos arrojan resultados no específicos (Brandt *et al.*, 2005).

Debido a estos inconvenientes, se hace necesario establecer marcadores para la identificación de *Coccidioides* más específicos y sensibles, ya que como hemos mencionado antes, existe una gran diversidad genética entre los aislados de estos hongos, según los hallazgos del presente trabajo y lo descrito por otros autores (Burt *et al.*, 1996; Burt *et al.*, 1997; Koufopanou *et al.*, 1997; Koufopanou *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2000a; Jewell *et al.*, 2008). De esta manera, los marcadores SCAR diseñados para otros hongos patógenos, pueden ser excelentes candidatos para este fin, como ha sido descrito por Frías De León *et al.* (20012), ya que estas secuencias han demostrado ser útiles para diferentes objetivos, entre éstos, la construcción de bibliotecas genómicas, el control biológico mediante el control de cepas de hongos en el medio ambiente, en programas de

mejoramiento, y en el desarrollo de ensayos sensibles que asocien la forma clínica de la enfermedad con la carga fúngica.

Considerando su alta especificidad y sensibilidad, los métodos moleculares poco a poco se están implementando en los laboratorios clínicos de rutina para confirmar la información proveniente de los métodos convencionales, y como auxiliares en el diagnóstico de casos dudosos de algunas micosis, así como para facilitar la caracterización de fuentes de infección y la consolidación de la información epidemiológica de esta micosis, sobre todo en los países de latinoamérica.

A pesar de que uno de los objetivos del presente trabajo era diseñar marcadores SCARs específicos para *C. immitis* y *C. posadasii*, éste no pudo llevarse a cabo, debido al reducido número de aislados pertenecientes a la especie *C. immitis*, y por la alta diversidad encontrada en todos los aislados, lo que hizo difícil identificar bandas especie-específicas en los patrones polimórficos AFLP, de manera que el marcador obtenido resultó específico sólo a nivel de género, sin embargo, el marcador SCAR E-AC/M-CAT₃₀₀, probado con aislados de México y Argentina, mostró una buena especificidad y sensibilidad, por lo que puede ser un buen candidato para la identificación de hongos del género *Coccidioides*, no obstante es necesario que el marcador sea evaluado con muestras clínicas y en diferentes fuentes de infección.

CONCLUSIONES

1. No se encontraron diferencias significativas en las características fenotípicas estudiadas de los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*.
2. La demostración en el presente trabajo, de una alta variabilidad genotípica en los hongos del género *Coccidioides*, debe alertar a las autoridades sanitarias en

las zonas endémicas para considerar una vigilancia más estrecha de esta enfermedad, debido a que pueden surgir cepas hipervirulentas o resistentes a los antifúngicos.

3. El marcador SCAR (E-AC/M-CAT₃₀₀) a partir de aislados autóctonos de México y Argentina, mostró ser altamente específico y sensible para la identificación de los hongos del género *Coccidioides*, y puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de la coccidioidomicosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbasi P, Miller S, Meulia T, Hoiting H, Kim J. 1999. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. *Appl Environ Microbiol* 65: 5421-5426.
2. Allnut TR, Newton AC, Lara A, Premoli A, Armesto JJ, Vergara R, Gardner M. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Mol Ecol* 8: 975–987.
3. Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman A. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
4. Bandelt H, Forster P, Röhl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
5. Baptista Rosas RC, Hinojosa A, Riquelme M. 2007. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western north american deserts. *Ann NY Acad Sci* 1111: 35–46.
6. Baptista Rosas RC, Riquelme M. 2007. Epidemiología de la coccidioidomicosis en México. *Rev Iberoam Micol* 24: 100-105.
7. Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Cecenas L, Reischl U, Gonzalez GM. 2004. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol* 42: 778–783.
8. Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfiel SL, Wengenack NL. 2007. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 45:173-178.

9. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1522.
10. Bowman BH, Taylor JW, White TJ. 1992. Molecular evolution of the fungi: human pathogens. *Mol Biol Evol* 9: 893–904.
11. Bowman BH, White TJ, Taylor JW. 1996. Human pathogenic fungi and their close non-pathogenic relatives. *Mol Phylogenet Evol* 6: 89–96.
12. Brandt, ME, Gaunt D, Iqbal N, McClinton S, Hambleton S, Sigler L. 2005. False-positive *Histoplasma capsulatum* Gen-Probe chemiluminescent test result caused by a *Chrysosporium* species. *J Clin Microbiol* 43: 1456-1458.
13. Burt A, Carter DA, Koenig GL, Whites TJ, Taylor JW. 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 770-773
14. Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW. 1997. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Mol Ecol* 6: 781–786.
15. Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. 2010. Agentes de micosis endémicas en un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros. *Rev Iberoam Micol* 27: 14–19.
16. Canteros CE, Toranzo A, Ibarra-Camou B, David V, Carrizo SG, Santillán-Iturres A, Serrano J, Fernández N, Capece P, Gorostiaga J, Chacón YA, Tonelli R, Boscaro G, Abiega C, Mendieta S, Fernández C, Fernández A, Vitale R, Santos P, Pizarro MR, López-Joffre MC, Lee W, Mazza M, Posse G, Tiraboschi IN, Negroni R, Davel G. 2010a. La coccidioidomicosis en Argentina, 1892-2009. *Rev Arg Microbiol* 42: 261-268.

17. Canteros CE, Toranzo A, Suárez-Alvarez RO, Davel G, Castañón-Olivares LR, Napoli J. 2009. Identidad genética del hongo causante del primer caso de coccidioidomicosis descrito por Alejandro Posadas en 1892. *Medicina (Buenos Aires)* 69: 215-220.
18. Cordeiro RA, Brilhante RSN, Rocha MFG, Bandeira SP, Fechine MAB, Camargo ZP, Sidrim JJC. 2010. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66: 65-72.
19. Cordeiro RA, Brilhante RSN, Rocha MFG, Fechine MAB, Camara LMC, Camargo ZP, Sidrim JJC. 2006. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from northeast Brazil. *Med Mycol* 44: 631-639.
20. Cordeiro RA, Brilhante RSN, Rocha MFG, Moura FEA, Camargo ZP, Sidrim JJC. 2007. Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. *Clin Microbiol Infect* 13: 449–451.
21. Cordeiro RA, Fechine MAB, Brilhante RSN, Rocha MFG, da Costa AKF, Nagao MATD, de Camargo ZP, Sidrim JJC. 2009. Serologic detection of coccidioidomycosis antibodies in northeast Brazil. *Mycopathologia* 167:187-190.
22. Cordeiro RA, Silva KRC, Brilhante RSN, Moura FBP, Duarte NFH, Marques FJF, Cordeiro RA, Filho RE, Araújo RWB, Bandeira TJPG, Rocha MFG, Sidrim JJC. 2012. *Coccidioides posadasii* infection in bats, Brazil. *Emerg Infect Dis* 18: 668-670.
23. Duarte Escalante E, Zúñiga G, Frías De León MG, Canteros C, Castañón Olivares LR, Reyes Montes MR. 2013. AFLP analysis reveals high genetic diversity but low population structure in *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina. *BMC Infect Dis* 13:411.
24. Egeberg RO, Elconin AE, Egeberg MC. 1964. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *J Bacteriol* 88: 473-476.

25. Elconin AF, Egeberg RO, Egeberg MC. 1964. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol* 87: 500-503.
26. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
27. Fisher FS, Bultman MW, Johnson SM, Pappagianis D, Zaborsky E. 2007. *Coccidioides* niches and habitat parameters in the southwestern United States. A matter of scale. *Ann NY Acad Sci* 1111: 47-72.
28. Fisher MC, Koenig GL, Taylor JW. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94: 73-84.
29. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, San-Blas G, Negroni R, Alvarez IG, Wanke B, Taylor JW. 2001. Biogeographic range expansion into South America by the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* mirrors human patterns of migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4558-4562.
30. Fisher, MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 2000a. Pathogenic clones versus environmentally driven population increase: analysis of an epidemic of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* 38: 807-813.
31. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 2000b. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Mol Biol Evol* 17: 1164-1174.
32. Fraser JA, Stajich JE, Tarcha EJ, Cole GT, Inglis DO, Sil A, Heitman J. 2007. Evolution of the mating type locus: insights gained from the dimorphic primary

- fungal pathogens *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, and *Coccidioides posadasii*. *Eukaryot Cell* 6: 622–629.
33. Frías De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MR. 2012. Development of specific SCAR markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 50: 673-679.
 34. Friedman L, Smith CE, Roessler WG, Berman RJ. 1956. The virulence and infectivity of twenty-seven strains of *Coccidioides immitis*. *Am J Hyg* 64: 198–210.
 35. Friedman L, Smith CE. 1957. The comparison of four strains of *Coccidioides immitis* with diverse histories. *Mycopathol Mycol Appl* 8:47-53.
 36. Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor JW. 2000. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 92: 406-410.
 37. Güssow D and Clackson T. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 4000.
 38. Haubold B, Hudson RR. 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847-848.
 39. Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W. 1995. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA. *J Med Vet Mycol* 33: 319-325.
 40. Hector RF, Laniado-Laborín R. 2005. Coccidioidomycosis a fungal disease of the Americas. *PloS Med* 2(1): e2.
 41. Hector RF, Rutherford GW, Tsang CA, Erhart LM, McCotter O, Anderson SM, Komatsu K, Tabnak F, Vugia DJ, Yang Y, Galgiani JN. 2011. The public health

- impact of coccidioidomycosis in Arizona and California. *Int J Environ Res Public Health* 8: 1150-1173.
42. Hideo Togashi R, Batista Aguiar FM, Barros Ferreira D, Matos de Moura C, Montezuma Sales MT, Ximenes Rios N. 2009. Pulmonary and extrapulmonary coccidioidomycosis: three cases in an endemic area in the state of Ceará, Brazil. *J Bras Pneumol* 35: 275-279.
 43. Jewell K; Cheshier R, Cage GD. 2008. Genetic diversity among clinical *Coccidioides* spp. isolates in Arizona. *Med Mycology* 46: 449-455.
 44. Kaufman L, Standard PG. 1987. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. *Ann Rev Microbiol* 41: 209-225.
 45. Koufopanou V, Burt A, Szaro T, Taylor JW. 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol Biol Evol* 18: 1246–1258.
 46. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5478–5482.
 47. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. 1998. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* [correction]. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 8414.
 48. Lacy GH, Swatek FE. 1974. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at amerindian middens in California. *Applied Microbiol* 27: 379-388.
 49. Laniado Laborín R. 2006. Coccidioidomycosis. Más que una enfermedad regional. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 19: 301-308.

50. Laniado Laborín R. 2007. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the western hemisphere. *Ann NY Acad Sci* 1111: 19–34.
51. Laniado Laborín R, Alcantar-Schramm JM, Cazares Adame R. 2012. Coccidioidomycosis: An update. *Curr Fungal Infect Rep* doi 10.1007/s12281-012-0084-z.
52. Laniado Laborín R, Cárdenas-Moreno RP, Álvarez-Cerro M. 1991. Tijuana: zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. *Salud Pública Mex* 33: 235-239.
53. Li K, Rouse D, Eystone E, German T. 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahlie*. *Mycol Res* 11: 1361-1368.
54. Linde M, Mattiesch L, Debener T. 2004. *Rpp1*, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data. *Theor Appl Genet* 109: 1261-1266.
55. Lindsley MD, Hurst SF, Nauren JI, Morrison CJ. 2001. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 39: 3505-3511.
56. Mandel MA, Barker BM, Kroken S, Rounsley SD, Orbach MJ. 2007. Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition. *Eukaryot Cell* 6: 1189–1199.
57. Manly BFJ 1997. *Randomization, Bootstrap, and Montecarlo Methods in Biology*. Chapman and Hall, London, 399 pp.
58. Martagon Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture

- extracts by real-time PCR. J Clin Microbiol 41: 1295-1298.
59. Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. 1993. How clonal are bacteria? Proc Natl Acad Sci USA 90: 4384-4388.
 60. Méndez Tovar LJ, Ramos Hernández JM, Manzano Gayosso P, García González A, Hernández Hernández F, Bazán Mora E, López Martínez R. 2007. Micosis sistémicas: experiencia de once años en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, México. Rev Mex Mic 25: 15-19.
 61. Millar BC, Jiru X, Walker MJ, Evans JP, Moore JE. 2003. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? J Clin Microbiol 41: 5778-5780.
 62. Mondragón González R, Méndez Tovar LJ, Bernal Vázquez E, Hernández Hernández F, López Martínez R, Manzano Gayosso P, Ríos Rosas C, Contreras Pérez C, Anides Fonseca AE. 2005. Detección de infección por *Coccidioides immitis* en Coahuila, México. Rev Argent Microbiol 37: 135-138.
 63. Montgomery DC: Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, 1991.
 64. Muñoz Hernández B, Castañón LR, Calderón I, Vázquez ME, Manjarrez ME. 2004. Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in Mexican patients. J Clin Microbiol 42: 1247-1249.
 65. Muñoz Hernández B, Martínez Rivera MA, Palma Cortés G, Tapia Díaz A, Manjarrez Zavala ME. 2008. Mycelial forms of *Coccidioides* spp. in the parasitic phase associated to pulmonary coccidioidomycosis with type 2 diabetes mellitus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27: 813-820.

66. Neafsey DE, Barker BM, Sharpton TJ, Stajich JE, Park DJ, Whiston E, Hung C, McMahan C, White J, Sykes S, Heiman D, Young S, Zeng Q, Abouelleil A, Aftuck L, Bessette D, Brown A, FitzGerald M, Lui A, Macdonald JP, Priest M, Orbach MJ, Galgiani JN, Kirkland TN, Cole GT, Birren BW, Henn MR, Taylor JW, Rounsley SD. 2010. Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Res* 20: 938-946.
67. Negroni R. 2011. Historia del descubrimiento de la coccidioidomicosis. *Rev Argent Dermatol* 92: 1-20.
68. Nei M. 1973. Analysis of of gene diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci USA* 70: 3321-3323.
69. Ophüls W. 1905. Further observations on a pathogenic mould formerly described as a protozoon (*Coccidioides immitis*, *Coccidioides pyogenes*). *J Exp Med* 1: 443-485.
70. Ouchterlony O, Nilsson LA. 1978. Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis. *In*: Weir, D.M. (ed.), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 19.1-19.44.
71. Pan S, Sigler L, Cole GT. 1994. Evidence for a phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). *Microbiology* 140: 1481-1494.
72. Pappagianis D. 1988. Epidemiology of coccidioidomycosis. *In*: McGinnis MR, ed. *Current topics in medical mycology*. New York: Springer Verlag. p. 199-238.
73. Pappagianis D, Einstein H. 1978. Tempest from Tehachapi takes toll or *Coccidioides* conveyed aloft and afar (Medical Information). *West J Med* 129: 527-530.
74. Pappagianis D, Zimmer BL. 1990. Serology of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 3: 247-268.

75. Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ, Galgiani JN. 1999. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J Infect Dis* 179: 518-521.
76. Posadas A. 1892. Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. *Ann Circ Med Argent* 15: 585-597.
77. Ramani R, Chaturvedi V. 2007. Antifungal susceptibility profiles of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* from endemic and non-endemic areas. *Mycopathologia* 163: 315-319.
78. Rixford E, Gilchrist TC. 1896. Two cases of protozoan (coccidioidal) infection of the skin and other organs. *Johns Hopkins Hosp Rep* 1: 209-268.
79. Roessler WG, Converse JL, Geating JA. 1961. Virulence assay of *Coccidioides immitis* in embryonated eggs. *J Bacteriol* 81: 226-32.
80. Rohlf FJ: *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software Inc.: New York; 1998.
81. Rowe JR, Newcomer VD, Wright ET. 1963. Studies of the soluble antigens of *Coccidioides immitis* by immunodiffusion. *J Invest Dermatol* 41: 225–233.
82. Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Small-scale preparation of plasmid DNA. Lysis by alkali, p. 1.25-1.28. *In* N. Ford, C. Nolan and M. Ferguson (ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
83. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 33: 2913-2919.
84. Schlüter PM, Harris SA. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol Eco Notes* doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01225.x

- Sigler L, Carmichael W. 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthroconidia. *Mycotaxon* 4: 349-488.
85. Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordar VS, Maiti R, Kodira CD, Neafsey DE, Zeng Q, Hung C, McMahan C, Muszewska A, Grynberg M, Mandel MA, Kellner EM, Barker BM, Galgiani JN, Marc J. Orbach MJ, Kirkland TN, Cole GT, Henn MR, Birren BW, Taylor JW. 2009. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 19: 1722-1731.
86. Taylor ML, Ruíz Palacios GM, Reyes Montes MR, Rodríguez Arellanes G, Carreto Binaghi LE, Duarte Escalante E, Hernández Ramírez A, Pérez A, Suárez Álvarez R, Roldán Aragón YA, Romero Martínez R, Sahaza Cardona JH, Sifuentes Osornio J, Soto Ramírez LE, Peña Sandoval G. 2005. Identification of the infectious source of an unusual outbreak of histoplasmosis, in a hotel in Acapulco, state of Guerrero, Mexico. *FEMS Immunol Med Microbiol* 45: 435-441.
87. Tintelnot K, De Hoog GS, Antweiler E, Losert H, Seibold M, Brandt Ma, Gerrits Van Den Ende AHG, Fisher MC. 2007. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol* 45: 385-393.
88. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. 2006. Novel approach to design primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 44: 1859-1862.

89. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
90. Weber J, Díez J, Selosse M, Tagu D, Le Tacon F. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. *Mycorrhiza* 12: 19-27.
91. Wernicke R. 1892. Ueber einen Protozoenbefund bei Mycosis fungoides. *Zentralbl Bakteriol* 12: 859-861.
92. Xu M, Huaracha E, Korban S. 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome* 44: 63-70.
93. Xu M, Korban S. 2002. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in apple genome. *Plant Mol Biol* 50: 803-818.
94. Zhivotovsky LA. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol Ecol* 8: 907-913.
95. Zimmerman CR, Snedker CJ, Pappagianis D. 1994. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 32: 3040-3042.

APÉNDICE

Apéndice 1. Secuencias de los aislados de *C. posadasii* de México y Argentina.

>M0I04 (No. Acceso JQ919961)

TTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCG
CTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTT
GATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCC
ACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCCTGCCCTCTCGACGCCCGTA
TCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGCATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAA
GTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATCCAGCCGCTCCA

>M1204(No. Acceso JQ919961)

TTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCG
CTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTT
GATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCC
ACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCCTGCCCTCTCGACGCCCGTA
TCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGCATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAA
GTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATCCAGCCGTC

>M1404 (No. Acceso JQ919962)

GTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGCCTCGCC
AGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGGAGAGGA
ACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCGGCAACGAT
GGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCACTCCTTGC
GTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGCATCTCGCGCAA
GGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATCCAGCCGT

>M1505(No. Acceso JQ919963)

CGTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCG
GCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCAC
GGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTC
GGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGAT
CACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGA
TCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAA

>M2305 (No. Acceso JQ919964)

GCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCG
GCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCAC
GGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTC
GGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGAT
CACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGA
TCTCGCCCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAAT

CCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGAC
ACCA

>M3005 (No. Acceso JQ919965)

TCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGC
CTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGG
AGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
CAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCA
CTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGCATC
TCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATCC
AGCCGTCTCCAA

>M3905 (No. Acceso JQ919966)

GTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGCCT
CGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGGAG
AGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCGGCA
ACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCACTC
CTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGCATCTCG
CGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATCCAGC
CGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGACACCA

>M5406 (No. Acceso JQ919967)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGA

>M5708 (No. Acceso JQ919969)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGA

>HU1 (No. Acceso JQ919970)

ACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGCCTCGCCAGTGC
CCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGGAGAGGAACGAG
AAGGACTCTTGGAATGCTGAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCGGCAACGATGGCT
GCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCACTCCTTGCGTTG

AGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCCTTGCATCTCGCGCAAGGA
TGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTT

>HU2 (No. Acceso JQ919971)

GTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGAATGCTGAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTC
GGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGAT
CACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCCTTGA
TCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAAT
CCAGCCGTCTCCA

>HU11 (No. Acceso JQ919972)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCCTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGA
CACCAAAA

>HU12 (No. Acceso JQ919973)

CTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
GCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATC
ACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCCTTGCAT
CTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATC
CAGCCGTCTCCAACATCGTC

>HU18 (No. Acceso JQ919974)

CTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
GCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATC
ACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCCTTGCAT
CTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATC
CAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGACA
CCA

>HU19 (No. Acceso JQ919975)

CTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
GCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATC
ACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAAATCTTGCAT
CTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATC
CAGCCGTCTCC

>HU24 (No. Acceso JQ919976)

CTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
GCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATC
ACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAAATCTTGCAT
CTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATC
CAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCCAATTGACATCCCACCAGTTGACA
CCA

>37.3 (No. Acceso JQ919977)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCA

>5256 (No. Acceso JQ919979)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCCAATTGACATCCCACCAGTTGA
CACCAAAA

>MA (No. Acceso JQ919980)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA

TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGA
CACCAAAAA

>SiFe (No. Acceso JQ919981)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGA
CACCA

>972579 (No. Acceso JQ919982)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCAATTGACATCCCACCAGTTGA
CACCAAAAA

>073089(No. Acceso JQ919983)

TCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
GCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATC
ACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCT

>073094 (No. Acceso JQ919984)

CGTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCG
GCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCAC
GGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTC
GGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGAT
CACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTC

>073129 (No. Acceso JQ919985)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCCTGTATGTTTCGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA

CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCCAATTGACATCCCACCAGTTGA
CACCA

>073130 (No. Acceso JQ919986)

CTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGG
CCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACG
GAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCG
GCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATC
ACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCCTTGCAT
CTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATC
CAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCCAATTGACATCCCACCAGTTGACA
C

>073131 (No. Acceso JQ919987)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAA
TCCAGCCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCCA

>083376 (No. Acceso JQ919988)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCCGGCC
TCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCACGGA
GAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCTCGGC
AACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGATCACT
CCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCCTTGCATCTC
GCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAGCTAACATGTTAAAAAATCCAG
CCGTCTCCAACATCGTCGTTGACCAGTGCTCCAAGGCCGGTGTCCCAATTGACATCCCACCAGTTGACACCA
AAAA

>083377 (No. Acceso JQ919989)

TCCGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGC
CGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTC
ACGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTC
TCGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAG

ATCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCTTG
CATCTCGCGCAAGGATGGGATA

>083380 (No. Acceso JQ919990)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAA

>083382 (No. Acceso JQ919991)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGA

>083381 (No. Acceso JQ919992)

CGCTCGTCCGTTAGACGCACATACATAATCAAATGCAGTTCTCTCACGCTCTCATCGCTCTCGTCGCTGCC
GGCCTCGCCAGTGCCAGCTCCCAGACATCCACCTTGCGCTGTATGTTTGAACCTTTTGTGTGGAACCTCA
CGGAGAGGAACGAGAAGGACTCTTGGAATGCTAACGGCTTGATGCTAGCTCAACTGCTTCGTTGAGGCTCT
CGGCAACGATGGCTGCACTCGCTTGACCGACTTCAAGTGCCACTGCTCCAAGCCTGAGCTCCCAGGACAGA
TCACTCCTTGCGTTGAGGAGGCCTGCCCTCTCGACGCCCGTATCTGTAAGTGAAGCGACACCAAATTCTTGC
ATCTCGCGCAAGGATGGGATAAGATGAGAAGATGGAAAGAAGTCGAAATGGCAG

RESEARCH ARTICLE

Open Access

AFLP analysis reveals high genetic diversity but low population structure in *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina

Esperanza Duarte-Escalante¹, Gerardo Zúñiga², María Guadalupe Frías-De-León³, Cristina Canteros⁴, Laura Rosio Castañón-Olivares¹ and María del Rocío Reyes-Montes^{1*}

Abstract

Background: *Coccidioides immitis* and *C. posadasii* cause coccidioidomycosis, a disease that is endemic to North and South America, but for Central America, the incidence of coccidioidomycosis has not been clearly established. Several studies suggest genetic variability in these fungi; however, little definitive information has been discovered about the variability of *Coccidioides* fungi in Mexico (MX) and Argentina (AR). Thus, the goals for this work were to study 32 *Coccidioides* spp. isolates from MX and AR, identify the species of these *Coccidioides* spp. isolates, analyse their phenotypic variability, examine their genetic variability and investigate the *Coccidioides* reproductive system and its level of genetic differentiation.

Methods: *Coccidioides* spp. isolates from MX and AR were taxonomically identified by phylogenetic inference analysis using partial sequences of the *Ag2/PRA* gene and their phenotypic characteristics analysed. The genetic variability, reproductive system and level of differentiation were estimated using AFLP markers. The level of genetic variability was assessed measuring the percentage of polymorphic loci, number of effective allele, expected heterozygosity and Index of Association (I_A). The degree of genetic differentiation was determined by AMOVA. Genetic similarities among isolates were estimated using Jaccard index. The UPGMA was used to construct the corresponding dendrogram. Finally, a network of haplotypes was built to evaluate the genealogical relationships among AFLP haplotypes.

Results: All isolates of *Coccidioides* spp. from MX and AR were identified as *C. posadasii*. No phenotypic variability was observed among the *C. posadasii* isolates from MX and AR. Analyses of genetic diversity and population structure were conducted using AFLP markers. Different estimators of genetic variability indicated that the *C. posadasii* isolates from MX and AR had high genetic variability. Furthermore, AMOVA, dendrogram and haplotype network showed a small genetic differentiation among the *C. posadasii* populations analysed from MX and AR. Additionally, the I_A calculated for the isolates suggested that the species has a recombinant reproductive system.

Conclusions: No phenotypic variability was observed among the *C. posadasii* isolates from MX and AR. The high genetic variability observed in the isolates from MX and AR and the small genetic differentiation observed among the *C. posadasii* isolates analysed, suggest that this species could be distributed as a single genetic population in Latin America.

Keywords: Genotypic variability, Haplotypes, Reproductive system

* Correspondence: remoa@unam.mx

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria No. 3000, México, D. F. 04510, México

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Species of the genus *Coccidioides*, primarily *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*, cause coccidioidomycosis, which is a disease endemic to North and South America [1]. This mycosis is most prevalent in the Southwestern United States (US), Northern Mexico (MX), Central America and the foothills region of South America [2]. The habitat conditions that permit the development of the saprophytic phase of these fungi are sandy soils in arid areas where the annual rainfall is less than 500 mm [3-5].

Coccidioidomycosis infection in humans and other mammals is caused by the inhalation of arthroconidia. The illness begins with acute respiratory symptoms that are typically benign and vanish spontaneously; however, the disease can evolve into progressive clinical forms that spread to the skin and subcutaneous, visceral and skeletal tissues. These severe progressive forms cause high morbimortality and are commonly associated with immunocompromised patients [6].

Coccidioidomycosis is an emerging disease because increased infection rates have been recorded in recent years from MX [7] and Argentina (AR) [8]. In endemic areas in the US, more than 100,000 primary human infections by *Coccidioides* spp. are estimated each year; a considerable increase in the incidence of this disease has been noted in recent years, particularly in California and Arizona. The increased incidence of the disease has been associated with a rise in the migration of individuals who have not previously been exposed to the fungus into the endemic areas [9].

The current epidemiology for coccidioidomycosis in MX is unknown, because no prevalence studies have been conducted in most Mexican states since 1960. However, according to the information that is available, more than 1,500 cases of primary coccidioidomycosis and 15 cases of disseminated disease are estimated annually. It is important to note that this estimate was based on epidemiological studies prior to 1994; since 1995, there are no records of coccidioidomycosis incidence in MX because this infection was excluded from reports prepared for the national epidemiological registry [10]. This suggests that the disease may have developed much as it has in the US, where prevalence and incidence rates have soared since the early 1990s [11].

Epidemiology in AR is similar to that in MX: there are few existing studies, although in recent years, several epidemiological studies have been performed. These studies include an investigation conducted by Canteros *et al.* [8] that sought to identify areas of endemic mycoses in 10 rural communities from the Teuco-Bermejito interfluvium, which is in the Chaco province. Although results from this study demonstrated that *Histoplasma capsulatum* was the principal agent of endemic mycoses, the researchers also indicated that the climatic conditions of the area are

optimal for *Coccidioides* development and thus that the potential for *Coccidioides* infections in the area should not be dismissed. In another recent study conducted by Canteros *et al.* [12], the authors performed a comprehensive retrospective review of all documented coccidioidomycosis cases in AR between 1892 and 2009. This review demonstrated that between 2006 and 2009, the disease incidence in the Catamarca province increased from a historical rate of less than 0.5 cases per 100,000 inhabitants to 2 cases per 100,000 inhabitants, indicating that coccidioidomycosis is an emerging disease in this region.

Because of the increased incidence of this disease in North and South America, several studies in recent decades have sought to apply molecular techniques to better understand the taxonomy and population biology of *Coccidioides*. Numerous studies, principally in the US, have focused on the genetic variability of *C. immitis* isolates and concluded that this fungus has high genetic recombination and no genetic structure among fungal isolates; however, the recombination process has never been observed [13-17]. A recent study that supports the presence of recombination was conducted by Jewell *et al.* [18], who used microsatellites to determine that outbreaks of coccidioidomycosis in Arizona, US, were caused by a single fungal clone that was likely hypervirulent, possessed a high level of genetic variation and showed no dominant subtypes among its isolates. The absence of genetic structure among *C. immitis* isolates and the presence of cryptic sex in both species of this fungus led to an investigation of whether isolates of *C. posadasii*, which is the dominant species in Latin American countries, have the same behavior as isolates of *C. immitis*, which is the dominant species in the Southwestern US. To find evidence that would indicate whether there is an expansion of the fungus in MX and AR, this study aimed to determine the phenotypic and genotypic variability and the population structure of two populations (MX and AR).

Methods

Isolates

Thirty two clinical isolates of *Coccidioides* spp. were used, 21 isolates from MX: one isolate (M0104) provided by Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; 6 isolates (M1204, M1404, M1505, M2305, M2805 and M3005) provided by UMAE Hospital de Especialidades No. 71, Instituto Mexicano del Seguro Social; one isolate (M3905) provided by Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud; one isolate (M5406) provided by Clínica Derma Care; one isolate (M5708) provided by Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"; 6 isolates (HU2, HU11, HU12, HU18, HU19 and HU24) and one reference strain (HU1) provided by Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León;

three isolates (37.3, 5256 and SiFe) provided by Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" and one isolate (MA) provided by Instituto Nacional de Pediatría; and 11 isolates from AR (972579, 073089, 073094, 073129, 073130, 073131, 083376, 083377, 083380, 083381 and 083382), provided by the Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (Additional file 1). The isolates and strains were preserved at 4°C in flasks with sterile water and in tubes with mycobiotic agar (Bioxón, Mexico, MX) both with and without mineral oil. The isolates and reference strain studied were deposited in the *Coccidioides* spp. Collection of the Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Biosafety

The culture and DNA extraction procedures for the isolates used in the present study were conducted in accordance with Biosafety Level 3 (BSL3) conditions.

Monospore cultures

From each isolate grown on mycobiotic agar for 1–2 weeks at 30°C, a conidial suspension was prepared using 1 mL of phosphate buffer (pH 7.4) and 0.05% Tween 20 (PBST). This suspension was diluted (1:1000) and 50 µL of the dilution was grown on mycobiotic agar. The Petri dishes were incubated at 30°C and observed for colony growth. One colony was selected from each plate and grown on mycobiotic agar slants at 30°C. The monospore cultures were then preserved in sterile water at 4°C.

Identification of the species of the *Coccidioides* spp. isolates

The DNA of each isolate was obtained following the procedure by Williams *et al.* [19] and Calderón *et al.* [20]. It was extracted and purified using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, GE). The mycelium was lysed using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals, Solon, OH, US) by homogenisation through a pattern with four periods of 40 s each at a speed of 6 m/s and placement of the tube on ice for 5 min between each period. The DNA concentration was determined by spectrophotometry and confirmed by gel electrophoresis on a 1.0% agarose gel with ethidium bromide (10 µg/ml), using different concentrations of λ phage (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). The DNA was stored at 4°C.

The oligonucleotides designed by Bialek *et al.* [21] were used for PCR. For the first PCR reaction, the reaction mixture comprised 10 ng of DNA in a 25 µL reaction volume containing 1X buffer, 200 µM dNTPs (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, US), 2.5 mM MgCl₂, 1.0 U of *Taq*

polymerase (Applied Biosystems) and 100 pmol of each oligonucleotide, CoI (5'-GTACTATTAGGGAGGATAATC GTT-3') and CoII (5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3'). The following program was used for the PCR: one cycle at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and 72°C for 1 min with a final extension step at 72°C for 5 min. A second PCR reaction was then conducted. The reaction mixture for this second reaction comprised 2 µL of the product from the first PCR in a total reaction volume of 25 µL that was composed of buffer, 200 µM dNTPs (Applied Biosystems), 1.5 mM MgCl₂, 1 U of *Taq* polymerase (Applied Biosystems) and 100 pmol of each oligonucleotide, CoIII (5'-ATCCACCTTGCGCTGTATG TTCA-3') and CoIV (5'-GGAGACGGCTGGATT TTTAACATG-3'). For the second PCR, the following program was used: one cycle at 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 min with a final extension step at 72°C for 5 min. The amplifications were conducted in an Esco Swift[™] Maxi[™] thermocycler (ESCO, Hatboro, PA, US). The amplified products were then separated on 1.5% agarose gels in 0.5X TBE buffer at 100 V for 60 min. A 100-bp DNA ladder (Invitrogen) was used to determine the molecular sizes of the products. The gel was visualised using a Gel Doc XR (Bio-Rad, CA, US) image documentation system.

To confirm the identity of all isolates as *C. posadasii*, the 526-bp amplicons obtained from the first PCR were purified using the QIAquick PCR kit (Qiagen) and sequenced at the Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM using an automated ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) sequencer. The sequences were edited using Chromas Lite 2.3 software (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) and the sequence alignments were analysed by the BLAST algorithm [22] to check similarities among all fungal sequences deposited in the GenBank database.

Phenotypic variation

Macromorphology

The 32 *C. posadasii* isolates grown on mycobiotic agar at 30°C for 10 days were observed to identify the morphological characteristics of each culture (colony colour and texture).

Growth rates

To determine the growth rates of the isolates, each isolate was grown on Petri dishes containing YEG-agar (1% yeast extract, 1% glucose and 1.5% agar) (Bioxón) for 10 days. Circles 7 mm in diameter were cut from the colony margins in each plate. Each circle was placed in the centre of a Petri dish with YEG-agar containing one of the following different NaCl concentrations: 0 M (0%), 0.034 M (2%), 0.068 M (4%), and 0.102 M (6%). The Petri dishes were

then immediately incubated at 30°C. Growth was determined by measuring the diameters of the colonies (cm) after 4, 8, 10 and 15 days of incubation. Each experiment was repeated four times. Subsequently, the growth rate for each isolate was determined using the following formula: growth rate = [(diameter of the colony - diameter of inoculum)/15 days of incubation].

Conidial size

The diameters of 40 conidia from each isolate grown on mycobiologic agar (Bioxón) and incubated at 37°C for 10 days were measured using a calibrated ocular microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, US).

Phenotypic data analysis

The MATLAB ver. 6.1 software package (Mathworks, Inc., Natick, MA, US) was used to analyse the phenotypic data for the growth rates. A two-way factorial design with repeated measurements was used to evaluate the incubation times (in days) and the different NaCl concentrations in the growth media to determine whether the isolate growth rates differed. In addition, the isolates were analysed by comparing their various growth rates and classifying the samples by their countries of origin. To analyse the conidial size, means were compared using the Tukey test.

Genotypic variability

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) assessments

The AFLP analyses were performed with DNA from the monospore cultures in accordance with Vos *et al.* [23] and Duarte-Escalante *et al.* [24]. The DNA was restriction digested with the endonucleases *EcoRI* and *MseI*. After digestion, adaptors were ligated to the resulting fragments. The fragments were then preamplified using primers E (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') and M (5'-GACGATGAGTCCTGGTAA-3'). Following this preamplification, selective PCR was performed in which the selective primers were nearly identical to primer E or M but were extended by specific two- or three-nucleotide combinations at their 3' terminus. Six primer combinations were used: E+AA:M+CAC, E+AA:M+CAT, E+AA:M+CTG, E+AA:M+CTC, E+AC:M+CAT, and E+AC:M+CTC. Primer labeling was performed by phosphorylating the 5' end of the *EcoRI* primers with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase and the amplified materials were analysed on 5% polyacrylamide slab gels. A 50-bp DNA ladder (Invitrogen) was used as a reference.

Statistical analyses of AFLP results

Bands on different gels between 100 and 400 bp were analysed. The AFLP markers were visually recorded, compared with the 50-bp DNA marker ladder, manually

coded and translated into binary data that indicated either their presence (1) or absence (0) (Additional file 2). From this AFLP marker data, estimates of the genetic diversity of the MX and AR isolates were calculated using the Shannon Index (S), assuming that each genotypic marker represented a distinct locus [25], and Nei's measure of genetic diversity (h), calculated using allelic frequencies [26]. Additionally, an expected heterozygosity by population (H) and an average heterozygosity (Hw) were calculated using allele frequencies in accordance with the Bayesian method employed by Zhivotovsky [27]. An AMOVA analysis using FMAD v1.1 β software [28] was used to calculate the partitioning of the molecular variance of the *C. posadasii* isolates from MX and AR at one hierarchical level (geographic origin).

The statistical significance of *Fst* and the partitioned molecular variance were evaluated by performing 10,000 random data permutations [29]. The genetic similarity between isolates was calculated with the Jaccard index. The genetic relationships among isolates were assessed by mean of the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) using the Jaccard matrix. Distortion of the inferred tree was assessed with the cophenetic correlation coefficient (CCCr) which was calculated using the Mantel test [30]. Multivariate statistical methods were carried out using the NTSYS-PC program (version 2.0, Exeter software) [31]. In addition, a haplotype network was performed to evaluate the genealogical relationships among the AFLP haplotypes using the median-joining method [32] implemented in NETWORK 4.2.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) [33], where branches with different lengths represent levels of evolutionary change. The parameters used were $\epsilon = 0$, 1:1 weight for transitions-transversions and connection criteria. To distinguish clonal and recombinant structures in *C. posadasii*, the Index of Association (I_A), was used, which is a statistical test that measures the degree of non-random association between alleles at different loci (linkage disequilibrium) [34]. Therefore, I_A is zero in strictly recombining populations and 1 in strictly clonal populations. I_A was calculated using the LIAN 3.5 software [35].

Results

Identification of the species of the *Coccidioides* spp. isolates

All the sequences obtained (accession no. JQ919960-JQ919967; JQ919969-JQ919977; JQ919979-JQ919994) were located between positions 902 and 1304 of *Ag2/PRA* gene in the *C. posadasii* genome (accession no. AF013256). The 32 isolates of *Coccidioides* spp. from MX and AR were identified as *C. posadasii* with a nucleotide identity > 99%, through of the phylogenetic inference analysis (Additional file 3).

Phenotypic variation

Macromorphology

The isolates presented the macromorphology typically described for the *C. posadasii*. The texture of the colonies was generally fuzzy with smooth edges; several colonies had a powdery appearance. For the majority of the isolates, the colour of the front was white with buff components. The reverse side for most of the isolates was buff; however, isolates 073089, HU12 and 083378 exhibited a brown pigmentation (data not shown).

Growth rates

The *C. posadasii* isolates grown in YEG-agar medium containing 4 and 6% NaCl had lower growth rates compared with controls (no NaCl) by a statistically significant margin ($p < 0.01$), whereas the isolates grown in medium containing 2% NaCl did not show statistically significant differences in growth rates compared to the controls. No statistically significant differences were observed after conducting analyses by country of origin (Table 1).

Conidial size

The arthroconidial sizes for the *C. posadasii* isolates ranged from 2.54 to 3.37 μm in width and 4.35 to 8.80 μm in length. Isolate HU12 had the largest arthroconidial size, with arthroconidia measuring 2.56 \times 8.80 μm ; however, statistically significant differences in arthroconidial size between HU12 and the other samples tested were not observed ($p < 0.05$).

Genotypic variability and population structure

AFLP data analyses

Six primer combinations yielded 170 amplified AFLP markers. The levels of genetic variation of *C. posadasii* from the MX and AR populations are shown in Table 2. In general, the MX and AR isolates had high genetic variability, as demonstrated by the calculated values for the different genetic diversity estimators (the effective number of alleles, the average heterogeneity and the Shannon Index (I), which is insensitive to the number of isolates analysed). The AMOVA showed that 95.21% of the molecular variance was distributed within the *C. posadasii* populations from MX and AR. Our results showed a small genetic differentiation between *C. posadasii* isolates of both countries ($F_{st} = 0.048$, $p = 0.0001$).

Furthermore, the dendrogram for the *C. posadasii* isolates yielded 10 clusters (Figure 1). The first cluster included two isolates from MX, with 56% similarity. Group II included 17 isolates from MX and AR with 70% similarity and showed two subgroups. Subgroup IIa included 9 isolates from AR and one clinical isolate from MX (isolate M1204) with 74% similarity, and subgroup

Table 1 Growth rates of the *C. posadasii* isolates in different NaCl concentrations

Isolate	Growth rates (cm/day)			
	NaCl (0%)	NaCl (2%)	NaCl (4%)	NaCl (6%)
M0104	3.48	3.55	2.28	1.4
M1204	3.45	3.11	1.63	0.75
M1404	2.83	2.9	1.58	0.66
M1505	2.85	2.8	1.93	1.06
M2305	2.18	2.15	1.6	1.03
M2805	3.01	2.95	2.03	1.23
M3005	2.35	2.46	1.31	0.98
M3905	3.68	3.4	1.8	1.06
M5406	2.91	3.6	2.5	1.13
M5708	2.7	3.51	2.23	1.31
HU1	3.58	3.78	2.58	1.3
HU2	3.13	3.91	2.1	1.05
HU11	3.63	3.28	2.23	1.43
HU12	3.56	3.65	2.43	1.13
HU18	3.21	3.15	2	1.16
HU19	2.26	2.6	1.63	0.9
HU24	3.45	3.5	2.06	1.26
37.3	3.5	3.8	2.45	1.48
5256	2.88	2.5	2	2.86
MA	3.45	3.4	2.1	1.01
SIFe	3.11	3.36	2.2	1.18
972579	3.05	3.35	2.11	1.26
073089	3.68	3.48	2.3	1.26
073094	3.53	3.1	2.16	1.1
073129	3.58	3.6	2.13	1.11
073130	2.88	2.86	1.46	0.95
073131	3.73	3.48	2.4	1.36
083376	2.65	2.91	1.61	0.9
083377	3.53	3.25	2.26	2.5
083380	3.16	3.46	1.93	1.28
083382	2.43	3.08	1.78	1.11
083381	3.05	2.96	2.73	1.05

IIb included 7 isolates from MX, with 73% similarity. Group III contained three isolates from MX with 73% intragroup similarity. Group IV consisted of one isolate from MX with 62% intragroup similarity. Group V consisted of two isolates from MX with 71% similarity. Group VI consisted of two isolates, one from MX and another from AR, with 70% similarity. Group VII included only one isolate (isolate 083381) from AR, with 63% similarity to group VI. Group VIII included two isolates from MX, with 65% similarity. Group IX consisted of only one isolate from MX, with 36% similarity with

Table 2 Polymorphism, effective number of alleles, genetic diversity and expected heterozygosity of *C. posadasii* isolates from MX and AR

Populations	P(%)	n_e	I	h
<i>C. posadasii</i> (MX)	91.76	1.5970 ± 0.0603	0.5011 ± 0.0382	0.3396 ± 0.0289
<i>C. posadasii</i> (AR)	71.76	1.4754 ± 0.0694	0.3951 ± 0.0503	0.2687 ± 0.0361

P (polymorphism); n_e (effective number of alleles); I (genetic diversity, Shannon's index); h (heterozygosity).
 MX (Mexico); AR (Argentina).

the above. Finally, group X included only one isolate from MX, with 35% similarity. The cophenetic correlation coefficient ($CCCr = 0.948$, $p = 0.0004$) suggested that the dendrogram accurately represented the original genetic similarities among the isolates.

The network of haplotypes demonstrated a large number of crosslinks among *C. posadasii* isolates and showed a small differentiation between the isolates from MX and AR.

Additionally, the number of mutations between each node (1–30) in the haplotype network demonstrated broad genetic variability (Figure 2).

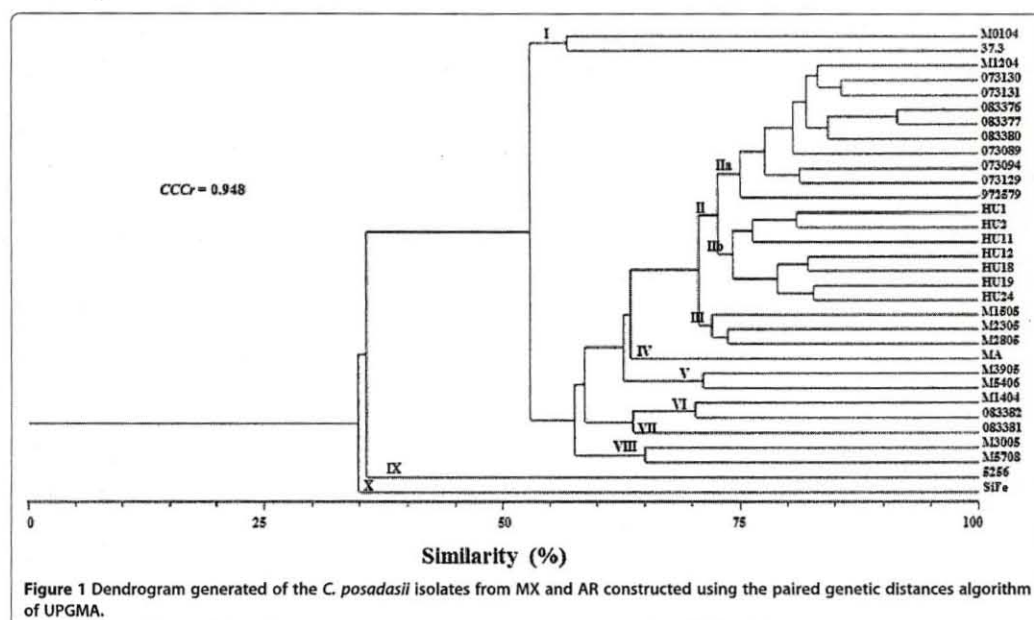
Finally, the I_A (0.0287) calculated for the isolates in this study suggested that these isolates have a recombinant reproductive system.

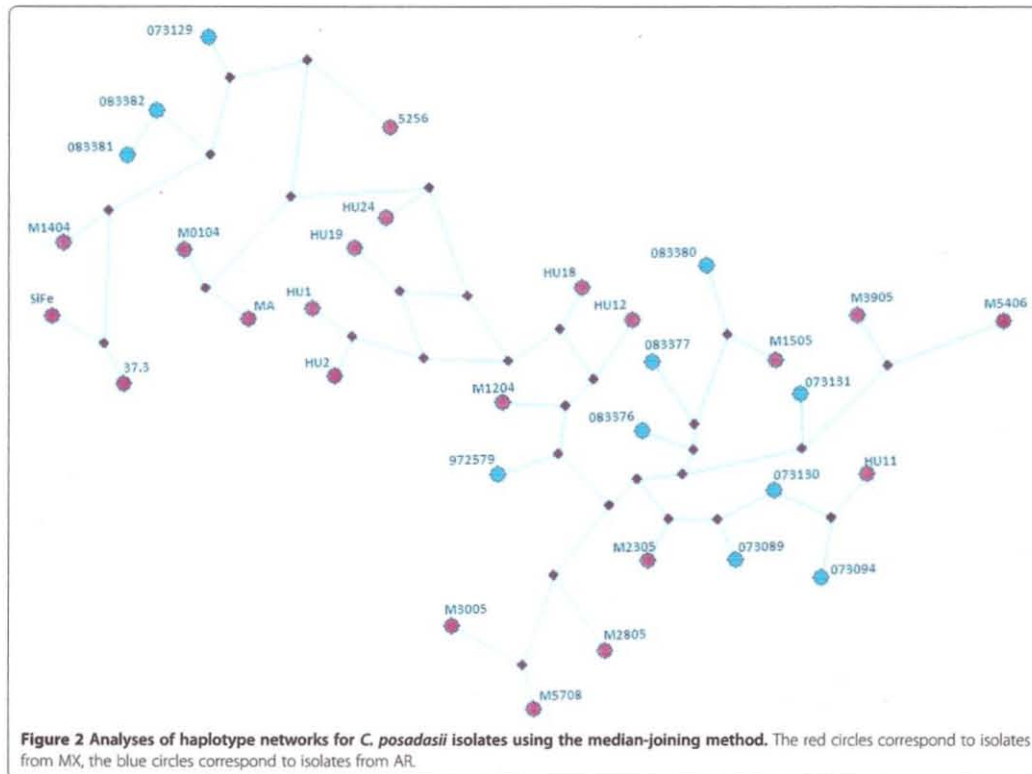
Discussion

The spread of coccidioidomycosis over recent years in endemic areas of MX and AR is sufficient to warrant attention given that there are so few studies of the disease. Therefore, it is important to be well informed about the

different aspects of *Coccidioides* spp. to carefully manage the disease. In this study, we estimated the genetic variability among *C. posadasii* isolates from MX and AR. Our results indicate that the partial *Ag2/PRA Coccidioides* spp. sequences obtained by Bialek et al. [21] method are useful for identify *C. posadasii* from different geographical origins. This fragment can also be used to identify *C. immitis* because this species presents in this region a deletion of 12 bases [36]. Thus, this fragment is not suitable to diversity or genetic structure studies, because it presents scarce variation. On the other hand, the results of phenotypic characterisation parameters (growth rates using different NaCl concentrations and arthroconidial size) showed no differences among the *C. posadasii* isolates.

The genetic diversity of the *C. posadasii* isolates from MX and AR showed high genetic variability using polymorphic AFLP. However, AMOVA indicated that this variation was not geographically structured. The results from this study suggested high rates of gene flow between isolates in MX and AR, which explains the scarce





differentiation found among them. A probable explanation about these findings may be the constant flow of genes between these populations favoring the air-borne dissemination of the fungus since the hyphae that constitute the saprobe or infectious stage fragment even with the lightest air currents, freeing the arthroconidia and easily travelling large distances in the wind [37,38]. The viability of the conidia in the environment is favored by the tolerability of the fungi to high temperatures (50°C) and their resistance to UV light (due to their melanine content) benefiting survival and longevity. Another possible explanation maybe high gene flow is a consequence of the constant movement of people across the continent or due to the migration of mammals [39], among these specific bat species which are long-distance migratory. This hypothesis is supported by the recent findings by Cordeiro *et al.* [40] who demonstrated the infection by *Coccidioides* spp. in these mammals.

The no-association among the *C. posadasii* isolates from MX and AR with their geographical origin, was supported by the dendrogram and haplotype network, confirm the scarce genetic differentiation observed

between them. These findings partially concur with Fisher *et al.* [39], who found low variability among *Coccidioides* spp. isolates and little genetic differentiation among isolates from South America and the US. Notwithstanding, the technique used in this study was the AFLP. This is a useful tool for establishing the changes in the genome of the fungi isolates allowing for simultaneously analysing many loci and detecting a greater number of polymorphic DNA markers than any other method based on PCR. However, a limiting factor in this study was the impossibility of comparing results with other studies on the structure of *Coccidioides* spp. populations due to the use of different methodologies. It is recommended that future studies use markers that have been validated and employed by other authors in studies of genetic variability of *Coccidioides* spp. in order to compare the results obtained with isolates from different geographic regions.

On the other hand, the high genetic variability found among the isolates studied maybe explained by a recombinant sexual reproductive system ($I_A = 0.0287$), as was suggested by other authors [1,13-17,41,42]. This mode of

reproduction was also supported by the presence of the potentially functional MAT idiomorph loci, MAT1-2 (HMG) and MAT1-1 (alpha-box) [41,42]. Thus, even though this species' sexual phase remains undescribed, studies indicate that, based on high variability, these fungi recombine, gaining advantages such as adaptation to new environments; thus, virulent or resistant strains could emerge, which may also explain the numerous recent epidemic outbreaks.

The observed high variability may also be explained by the possibility that the different genotypes could adapt to other environments under inappropriate developmental conditions, which is true for the isolate "MA", found in a patient originally from the state of Campeche, located in the Southeast region of MX, who claimed to have never left the state. This region has climatic conditions different from the preferred fungal growth conditions. Similarly, adaptation to new environments facilitates the appearance of hypervirulent strains, as suggested by Fisher *et al.* [1] and Jewell *et al.* [18].

It is important to understand variability among these fungi, which has also been investigated in recent publications, to determine genotype distributions among populations, monitor outbreaks, assess variations in virulence and predict disease progression [18,43,44]. Several lines of research that pertain to this issue are in progress that will further our understanding of the underlying biology of these pathogens and their interactions with other living species.

Conclusions

Phenotypic characterisation indicated no differences among the *C. posadasii* isolates studied. The different estimators of genetic variability employed indicated that the isolates from MX and AR had high genetic variability. The AMOVA showed a small genetic differentiation among the *C. posadasii* populations analysed from MX and AR; thus, these populations were genetically similar. Furthermore, the I_A calculated for the isolates suggested that the *C. posadasii* isolates had recombinant reproductive systems, which would contribute to the high variability found among the isolates.

Additional files

Additional file 1: Source and geographic origin of *Coccidioides posadasii* isolates.

Additional file 2: Binary data matrix. Each AFLP band was treated as a separate character and scored 1 (present) or 0 (absent).

Additional file 3: The 32 isolates of *Coccidioides* spp. from MX and AR were identified as *C. posadasii* through of the phylogenetic inference analysis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MRRM, EDE were involved in the study design, analysed and interpreted the results and drafted the manuscript. EDE and MGFDL performed the experiments. GZ conducted data analysis and participated in drafting the manuscript and provided a critical review of the manuscript. CC participated in the study design and provided a critical review of the manuscript. RCO performed microscopic fungal identification. MRRM conceptualized and coordinated the project. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This paper is a partial fulfilment for the graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). E. Duarte-Escalante acknowledges support from the Program in Biological Sciences.

This project was funded by PAPIIT-DGAPA (IN215509-3).

The authors would like to thank to Actuary Dolores Hernández who provided statistical analysis support.

Author details

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria No. 3000, México, D. F. 04510, México. ²Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, ProL de Carpio y Plan de Ayala. Col. Sto. Tomás, 11340, México, D. F., México. ³División de Investigación, Hospital Juárez de México, Edificio E. Av. Instituto Politécnico Nacional 5160, Col. Magdalena de las Salinas, 07760, México, D. F., México. ⁴Departamento de Micología, INEI ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Velez Sarsfield 563, 1281, Buenos Aires, Argentina.

Received: 18 January 2013 Accepted: 30 August 2013

Published: 3 September 2013

References

1. Fisher MC, Koenig GL, Taylor JW: Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. Nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002, 94:73-84.
2. Hector RF, Laniado-Laborín R: Coccidioidomycosis A fungal disease of the Americas. *PLoS Med* 2005, 2:e2.
3. Fisher FS, Bultman MW, Johnson SM, Pappagianis D, Zaborosky E: *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States: A matter of scale. *Ann NY Acad Sci* 2007, 1111:47-72.
4. Kolivras KN, Johnson PS, Comrie AC, Yool AR: Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever). *Aerobiologia* 2001, 17:31-42.
5. Kolivras KN, Comrie AC: Modeling valley fever (coccidioidomycosis) incidence on the basis of climate conditions. *Int J Biometeorol* 2003, 47:87-101.
6. Laniado-Laborín R, Alcantar-Schramm JM, Cazares-Adame R: Coccidioidomycosis: an update. *Curr Fungal Infect Rep* 2012, 6:113-120.
7. Laniado-Laborín R: Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the western hemisphere. *Ann NY Acad Sci* 2007, 1111:19-34.
8. Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R: Agentes de micosis endémicas en un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros. *Rev Iberoam Micol* 2010, 27:14-19.
9. Hector RF, Rutherford GW, Tsang CA, Erhart LM, McCotter O, Anderson SM, Komatsu K, Tabnak F, Vugia DJ, Yang Y, Galgiani JN: The public health impact of coccidioidomycosis in Arizona and California. *Int J Environ Res Public Health* 2011, 8:1150-1173.
10. Laniado-Laborín R: Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in Mexico. *Rev Iberoam Micol* 2007, 24:249-258.
11. Baptista Rosas RC, Riquelme M: Epidemiología de la coccidioidomycosis en México. *Rev Iberoam Micol* 2007, 24:100-105.
12. Canteros CE, Toranzo A, Ibarra-Camou B, David V, Carrizo SG, Santillán-Iturres A, Serrano J, Fernández N, Capece P, Gorostiaga J, Chacón YA, Tonelli R, Boscaro G, Abiega C, Mendieta S, Fernández C, Fernández A, Vitale R, Santos P, Pizarro MR, López-Joffe MC, Lee W, Mazza M, Posse G, Tiraboschi IN, Negroni R, Davel G: La coccidioidomycosis en Argentina, 1892-2009. *Rev Arg Microbiol* 2010, 42:261-268.

13. Burt A, Carter DA, Koenig GL, Whites TJ, Taylor JW: **Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis***. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:770-773.
14. Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW: **Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas**. *Mol Ecol* 1997, **6**:781-786.
15. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW: **Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis***. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:5478-5482.
16. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW: **Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* [correction]**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:8414.
17. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW: **Pathogenic clones versus environmentally driven population increase: analysis of an epidemic of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis***. *J Clin Microbiol* 2000, **38**:807-813.
18. Jewell K, Cheshier R, Cage GD: **Genetic diversity among clinical *Coccidioides* spp. isolates in Arizona**. *Med Mycol* 2008, **46**:449-455.
19. Williams RH, Ward E, McCartney HA: **Methods for integrated air sampling and DNA analysis for the detection of airborne fungal spores**. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:2453-2459.
20. Calderón C, Ward E, Freeman J, McCartney A: **Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays**. *J Aerosol Sci* 2002, **3**:283-296.
21. Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Cecenas L, Reischl U, Gonzalez GM: **PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen**. *J Clin Microbiol* 2004, **42**:778-783.
22. Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman A: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
23. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijns M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M: **AFLP: a new technique for DNA fingerprinting**. *Nucleic Acids Res* 1995, **23**:4407-4414.
24. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Nava-Ramírez O, Córdoba S, Refojo N, Arenas R, Delhaes L, Reyes-Montes MR: **Population structure and diversity in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* isolates from different sources and geographic origins**. *Mem I Oswaldo Cruz* 2009, **104**:427-433.
25. Allnut TR, Newton AC, Lara A, Premoli A, Armesto JJ, Vergara R, Gardner M: **Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer**. *Mol Ecol* 1999, **8**:975-987.
26. Nei M: **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, **70**:3321-3323.
27. Zhivotovskiy LA: **Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers**. *Mol Ecol* 1999, **8**:907-913.
28. Schlüter PM, Harris SA: **Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data**. *Mol Ecol Notes* 2006, **6**:569-572.
29. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM: **Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data**. *Genetics* 1992, **131**:479-491.
30. Manly BFJ: *Randomization, Bootstrap, and Monte Carlo Methods in Biology*. London: Chapman and Hall; 1997.
31. Rohlf FJ: *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software Inc; 1998.
32. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A: **Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies**. *Mol Biol Evol* 1999, **16**:37-48.
33. Polzin T, Daneschmand SV: **On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs**. *Oper Res Lett* 2003, **31**:12-20.
34. Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG: **How clonal are bacteria?** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:4384-4388.
35. Haubold B, Hudson RR: **LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data**. *Bioinformatics* 2000, **16**:847-848.
36. Canteros CE, Toranzo A, Suárez-Alvarez R, Davel G, Castañón-Olivares LR, Napoli J: **Identidad genética del hongo causante del primer caso de coccidioidomycosis descrito por Alejandro Posadas en 1892**. *Medicina (Buenos Aires)* 2009, **69**:215-220.
37. Pappagianis D, Einstein H: **Tempest from Tehachapi takes toll or *Coccidioides* conveyed aloft and afar (Medical Information)**. *West J Med* 1978, **129**:527-530.
38. Laniado-Laborin R: **Coccidioidomycosis. Más que una enfermedad regional**. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006, **19**:301-308.
39. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, San-Blas G, Negroni R, Gutiérrez-Álvarez I, Wanke B, Taylor JW: **Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:4558-4562.
40. Cordeiro RA, Silva KRC, Brilhante RSN, Moura FBP, Duarte NFH, Marques FJF, Cordeiro RA, Moreira Filho RE, Araújo RWB, Bandeira TJPG, Rocha MFG, Sidrim JJC: ***Coccidioides posadasii* Infection in bats, Brazil**. *Emerg Infect Diseases* 2012, **18**:668-670.
41. Fraser JA, Stajich JE, Tarcha EJ, Cole GT, Inglis DO, Sil A, Heltman J: **Evolution of the mating type locus: insights gained from the dimorphic primary fungal pathogens *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, and *Coccidioides posadasii***. *Eukaryot Cell* 2007, **6**:622-629.
42. Mandel MA, Barker BM, Kroken S, Rounsley SD, Orbach MJ: **Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition**. *Eukaryot Cell* 2007, **6**:1189-1199.
43. Neafsey DE, Barker BM, Sharpton TJ, Stajich JE, Park DJ, Whiston E, Hung C, McMahan C, White J, Sykes S, Heiman D, Young S, Zeng Q, Abouelleil A, Aftuck L, Besette D, Brown A, FitzGerald M, Lui A, Macdonald JP, Priest M, Orbach MJ, Galgiani JN, Kirkland TN, Cole GT, Birren BW, Henn MR, Taylor JW, Rounsley SD: **Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control**. *Genome Res* 2010, **20**:938-946.
44. Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordan VS, Maiti R, Kodira CD, Neafsey DE, Zeng Q, Hung C, McMahan C, Muszewska A, Grynberg M, Mandel MA, Kellner EM, Barker BM, Galgiani JN, Marc J, Orbach MJ, Kirkland TN, Cole GT, Henn MR, Birren BW, Taylor JW: **Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives**. *Genome Res* 2009, **19**:1722-1731.

doi:10.1186/1471-2334-13-411

Cite this article as: Duarte-Escalante et al.: AFLP analysis reveals high genetic diversity but low population structure in *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina. *BMC Infectious Diseases* 2013 **13**:411.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Mycologic Forum

Molecular markers in the epidemiology and diagnosis of coccidioidomycosis



Esperanza Duarte-Escalante^a, María Guadalupe Frías-De-León^b, Gerardo Zúñiga^c,
Erick Martínez-Herrera^a, Gustavo Acosta-Altamirano^b, María del Rocío Reyes-Montes^{a,*}

^a Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF, Mexico

^b División de Investigación, Hospital Juárez de México, México DF, Mexico

^c Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2013

Accepted 27 September 2013

Available online 20 November 2013

Keywords:

Coccidioides spp.

Genetic variability

Molecular markers

ABSTRACT

The prevalence of coccidioidomycosis in endemic areas has been observed to increase daily. To understand the causes of the spread of the disease and design strategies for fungal detection in clinical and environmental samples, scientists have resorted to molecular tools that allow fungal detection in a natural environment, reliable identification in clinical cases and the study of biological characteristics, such as reproductive and genetic structure, demographic history and diversification. We conducted a review of the most important molecular markers in the epidemiology of *Coccidioides* spp. and the diagnosis of coccidioidomycosis. A literature search was performed for scientific publications concerning the application of molecular tools for the epidemiology and diagnosis of coccidioidomycosis. The use of molecular markers in the epidemiological study and diagnosis of coccidioidomycosis has allowed for the typing of *Coccidioides* spp. isolates, improved understanding of their mode of reproduction, genetic variation and speciation and resulted in the development specific, rapid and sensitive strategies for detecting the fungus in environmental and clinical samples. Molecular markers have revealed genetic variability in *Coccidioides* spp. This finding influences changes in the epidemiology of coccidioidomycosis, such as the emergence of more virulent or antifungal resistant genotypes. Furthermore, the molecular markers currently used to identify *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* are specific and sensitive. However, they must be validated to determine their application in diagnosis.

This manuscript is part of the series of works presented at the "V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi" (Oaxaca, Mexico, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Marcadores moleculares en la epidemiología y el diagnóstico de la coccidioidomycosis

RESUMEN

Se ha descrito un aumento constante de la prevalencia de coccidioidomycosis en zonas endémicas. Para conocer las causas de esta expansión de la enfermedad y planificar estrategias para la detección del hongo en muestras clínicas y ambientales, se ha recurrido al uso de instrumentos moleculares que permitan la detección de estos hongos en su ambiente natural, su identificación fiable en los casos clínicos y el estudio de sus características biológicas, historia demográfica, diversificación y estructura reproductora y genética. El presente estudio representa una revisión de las implicaciones más importantes de los marcadores moleculares en la epidemiología de *Coccidioides* spp. y el diagnóstico de la coccidioidomycosis. Para ello, se efectuó una búsqueda de los artículos publicados sobre la aplicación de los instrumentos moleculares en la epidemiología y el diagnóstico de la coccidioidomycosis. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la epidemiología y el diagnóstico de la coccidioidomycosis ha permitido tipificar aislamientos de *Coccidioides* spp., conocer su modo de reproducción, variabilidad genética y su especiación, así como la planificación de estrategias más rápidas, específicas y sensibles para detectar el hongo en muestras ambientales y clínicas. Los marcadores moleculares han revelado la variabilidad genética de *Coccidioides*, hallazgo importante porque puede influir en la epidemiología de la coccidioidomycosis,

Palabras clave:

Coccidioides spp.

Variabilidad genética

Marcadores moleculares

* Corresponding author.

E-mail address: remoa@unam.mx (M.R. Reyes-Montes).

como la aparición de genotipos más virulentos o resistentes a los antimicóticos. Por otro lado, los marcadores moleculares para la identificación de *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, descritos hasta la fecha, son específicos y sensibles; sin embargo, deben validarse para determinar su aplicación en el diagnóstico.

Este artículo forma parte de una serie de estudios presentados en el «V International Workshop: Molecular genetic approaches to the study of human pathogenic fungi» (Oaxaca, México, 2012).

© 2013 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

The genus *Coccidioides* consists of two closely related species, *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. Both species have been classified in the Onygenales order and Ascomycota phylum. *Coccidioides* is a dimorphic pathogen that grows as a filamentous saprobe in soil when not infecting mammals. This phase is very resistant, which allows the fungus to remain viable in arid or semi-arid soils for months or years. Humid soil favors fungal growth, which gives rise to the formation of asexual propagules (arthroconidia). The wind disperses the arthroconidia and they can later be inhaled by humans or animals.^{15,28} Once in the host, the arthroconidia become spherules, which is a morphological change of polarized isotropic growth. Spherules subsequently differentiate to produce internal spores (endospores). When the spherules rupture, the endospores are released and are able to propagate in the host and restart the spherulation cycle, a process that may result in systemic fungal infection in humans and other vertebrates.⁴ Previously, *C. immitis* was the only known causal agent of coccidioidomycosis. However, after 2002, based on microsatellite analysis, it was concluded that this species includes two different taxa: *C. immitis*, which is endemic in California and *C. posadasii*, which is endemic in the southwestern part of the United States of America and northern Mexico, as well as Central and South America.¹⁶ Currently, an increasing number of outbreaks have occurred in endemic areas, which has generated interest in studying these fungi and their genetic and reproductive characteristics, demographic history and diversification process. Depending on the purpose of study, several molecular markers, alone or in combination, have been used in the development of specific and sensitive strategies for the diagnosis of coccidioidomycosis.

Molecular markers

Molecular markers are a dataset collected from various molecular techniques and represent unique genetic traits in individuals, populations or species. Variants of these genetic traits are the result of randomly occurring mutations or mutations influenced by the environment. The latter results in a genetic variation (polymorphism) and is essential for the adaptation to environmental changes and, therefore, the survival of the species.²⁴

In order to detect genetic differences in the molecular markers, several properties must be present: whether variable or polymorphic, the genetic change must have a defined inheritance pattern, be observed frequently in the genome, occur under neutral selection (not influenced by the environment), be easily accessed, and have high reproducibility. Because it is extremely difficult to find a molecular marker that meets all the above criteria, some authors use combinations of different molecular markers, as they are most informative.²⁴

Molecular markers have been used in the study of coccidioidomycosis to identify species, type isolates, determine the structure or reproductive mode and identify the degree of genetic differentiation between isolates and species. At the clinical level, knowledge of the genetic variability of the *Coccidioides* species, allows for the development of antifungal agents and vaccines, because their design will take into account genetic diversity, thus

ensuring that the action of these biological products reliable covers all genotypes of the species. Furthermore, the use of molecular markers is an alternative to improve the diagnosis of coccidioidomycosis, because conventional methods for detecting and identifying the fungus are time-consuming and less sensitive and specific.

Role of molecular markers in the epidemiology of coccidioidomycosis

Genetic variability of *Coccidioides* spp.

The first studies identifying genotypic variability in populations of the *Coccidioides* genus only included *C. immitis*; *C. posadasii* was not formally recognized until 2002. The first genotypic method used to analyze the genetic variability and related isolates of *C. immitis* was described by Zimmermann et al.³⁸ In this study, they used Restriction Fragment Length Polymorphic (RFLP) from DNA obtained from 15 patient-isolates in California. Their results showed a similar RFLP pattern in 13 of the 15 isolates and a second pattern in the remaining two isolates, which indicated genetic diversity between the two isolates and the remainder of the isolates studied. RFLP involves obtaining DNA fragments by restriction endonuclease digestion. These fragments may vary in size and number, enabling the observation of polymorphisms among the isolates.

Furthermore, Burt et al.⁹ studied the pattern of genetic variation in 25 isolates of *C. immitis* from a hospital in Tucson, Arizona, using PCR amplification and Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) detection. Their results also showed genetic variation among the examined isolates. In SSCP, double-stranded fragments are denatured by heating and then cooled to prevent further association. Single chain molecules of DNA can form secondary structures due to internal base pairing. These differences in secondary structure cause the DNA strands to migrate differently during electrophoresis with non-denaturing acrylamide. The variation in electrophoretic mobility of single-stranded DNA is likely due to changes caused by nucleotide substitutions. The variable bands are extracted from the gel and sequenced. When polymorphic regions are found, new oligonucleotides are designed and used to amplify the fragments from each isolate studied.¹³

In addition, Burt et al.¹¹ utilized DNA Multilocus Sequence Typing (MLST) of *C. immitis* isolates from Arizona, California and Texas, to obtain information about the structure of fungal populations. There was evidence of genetic differentiation among the three populations studied, which suggests a very low level of gene flow between them. MLST involves the PCR amplification of fragments (450–500 bp) of various housekeeping genes (7–8 genes), followed by sequencing both strands (alleles) to observe sequence changes. Analysis of changes in the fungal housekeeping genes allows for typing populations or isolates based on their allelic profiles.¹

Recently, Sharpton et al.³² and Neafsey et al.²⁵ used Whole Genome Shotgun (WGS) sequencing of *C. immitis* and *C. posadasii*

isolates and showed that they possess significant genetic variation in their populations. The WGS approach, in which the whole genome is sheared into millions of fragments that are sequenced and reassembled to produce a series of sequence “scaffolds”, has been used to sequence the genome of various organisms.

C. immitis reproductive mode

Early investigations into the structure of recombinant *C. immitis* was provided by Burt et al.,⁹ who used Sequencing With Arbitrary Primer Pairs (SWAPP) in conjunction with SSCP, to study *C. immitis* isolates from Tucson, Arizona. Their results revealed genetic variability in the studied *C. immitis* isolates, which supports the existence of a sexual recombination process in this fungus. The SWAPP technique is a variation of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). SWAPP uses two different 20 bp oligonucleotides, which are aligned at low stringency temperatures. Bands that do not show any variation in agarose gel electrophoresis are extracted to perform SSCP, as described above.¹⁰

Furthermore, Koufopanou et al.,^{21–23} by sequencing five nuclear gene fragments from a sample of 17 *C. immitis* strains and analyzing the genealogy of each of the five loci, showed a minimum length between them, which is indicative of no recombination. However, when the genealogy of the loci was analyzed together, evidence of recombination was found. To acquire partial gene sequences, PCR is required and oligonucleotides are used to amplify the partial gene regions of a set of isolates under study. Oligonucleotides are designed from the GenBank sequences for the fungus of interest or a close relative or by using SSCP or Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR) markers.¹² The advantage of this method is that it achieves the highest possible resolution when obtaining the genetic information.

Other work, developed by Fisher et al.,¹⁷ focuses on elucidating the genetic diversity and the mode of reproduction of *C. immitis* isolates. They used two types of genetic markers, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and Short Tandem Repeats (STRs). Their results showed wide multilocus genotypic diversity for two of the loci studied. The population structure was consistent with a recombinant population. A SNP is a DNA sequence variation that affects a single nucleotide in the genome. SNPs exist throughout the genome and are abundant, particularly in the human genome, with a rate of one SNP per 1000 base pairs.³⁷ Most SNPs are located in noncoding regions and do not have a direct impact on the phenotype of an individual. However, some SNPs introduce mutations in expressed sequences or in the regions that influence gene expression (promoters, enhancers) and can induce changes in the structure or regulation of proteins. Thus, SNPs have the potential to detect functional genetic variation. Alternatively, microsatellites, SSRs or STRs consist of a length of DNA of a few nucleotides that are repeated several times in tandem and are scattered throughout the genomes of eukaryotes. They are often displayed as hypervariable regions and usually show tens of alleles in a locus that differs in the number of repeats. Microsatellites are relatively small and therefore can be easily PCR-amplified using DNA extracted from various sources. Polymorphisms can be detected on a sequencing gel and the availability of automated DNA sequencers allows for ultrafast analysis of a large number of samples.¹⁴

In addition, Fisher et al.¹⁶ used SNPs, the partial sequences of genes and microsatellites to analyze a considerable number of *Coccidioides* spp. isolates from various geographical regions and showed the separation of the two taxa of *Coccidioides* corresponding to two phylogenetic species, which supports previous findings. They also confirmed that *C. posadasii* represents a monophyletic recombinant clade.

Speciation of *Coccidioides* spp.

The studies carried out by Koufopanou et al.,^{21–23} who used partial sequences of known genes, were the first to demonstrate the existence of cryptic species in the *Coccidioides* genus. Moreover, Fisher et al.,¹⁶ using microsatellites as mentioned above, confirmed the separation of the two taxa of the *Coccidioides* genus, which correspond to two phylogenetic species. Moreover, the results of the phylogenetic analysis defined the separation of the two species. For isolates from Californian endemic areas, the name of *C. immitis* was reserved, and isolates from the endemic areas of Arizona, Texas, Mexico and South America were referred to as *C. posadasii*.

Undoubtedly, the application of various molecular markers to studies on the genetic variability of *C. immitis* and *C. posadasii*, demonstrated that both species show wide genetic variability, most likely due to a process of sexual recombination, for which there is increasingly compelling evidence in these fungi. Moreover, this variability is becoming more important as new genotypes may appear, possibly with increased virulence or antifungal resistance, which may directly affect the management of patients with coccidioidomycosis and explains the increased number of disease cases in endemic areas and non-endemic areas. Thus, it is important to conduct further studies on the genetic variation of these species that contributes to the epidemiology of the disease.

Role of molecular markers in the diagnosis of coccidioidomycosis

Laboratory methods for the diagnosis of fungal infections use three broad approaches: microscopic detection of the etiologic agent in clinical material, the isolation and identification of the fungus in cultures, and the detection of a serological response to the pathogen or a marker of their presence, such as a fungal cell constituent or metabolic product. In recent years, new diagnostic procedures based on the detection of fungal DNA in clinical material have been developed; however, these techniques have not yet had a significant impact in most clinical laboratories.

Molecular techniques for the detection and identification of *Coccidioides* spp. can be divided into two types: (a) signal amplification methods using nucleic acid hybridization, which the hybridization probes can be used either to confirm the identification of a culture or to identify the fungi in tissue sections, and (b) nucleic acid amplification, which includes all PCR-based techniques.² The hybridization methods use chemiluminescent probes, such as the Accuprobe and Diversi-Lab systems commercially available from Gen-Probe, Inc. (San Diego, CA) and Bacterial Barcodes, Inc. (Athens, GA), respectively and have been proposed for detecting *Coccidioides* and other fungi. The PCR-based techniques are a result of specific research with the fungus and these offer the greatest potential sensitivity and specificity for the detection and identification of *Coccidioides*.

For PCR, a wide range of targets have been used, highlighting specific *Coccidioides* genes, such as the genes *Ag2/PRA*, *CSA* and rRNA genes (18S, 28S, 5.8S rRNA genes), but the latter are the most frequently used because of their universal nature and large copy number, which gives them greater sensitivity. The PCR conditions used to detect *Coccidioides* species are single, multiplex, nested, semi-nested, real-time and PCR-RFLP (Table 1). These procedures are distinctive because of their specificity and sensitivity, which are adequate for properly diagnosing coccidioidomycosis and detecting the pathogen in environmental samples. However, implementation of these techniques in hospital laboratories has not yet begun. These techniques have not been validated in coccidioidomycosis-endemic areas because the reproducibility between laboratories is unknown. Another aspect which has

Table 1
Molecular markers used in the diagnosis of coccidioidomycosis.

Molecular marker	Important characteristics
Chemiluminescent DNA probe (Accuprobe) assays developed by Gen-Probe, Inc. (San Diego, CA) for the rapid identification of <i>C. immitis</i> and <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Chemiluminescent probes commercially available by Gen-Probe, Inc. were evaluated in comparison with exoantigen tests. The probe for the identification of <i>C. immitis</i> was found to have specificity and sensitivity of 100% ¹
<i>C. immitis</i> -specific oligonucleotides generated from the CSA gene sequence, which encodes a 19-kDa antigen specific to the fungus. The oligonucleotides amplify a 520-bp fragment of <i>C. immitis</i>	The marker showed specificity only when amplifying <i>C. immitis</i> DNA and high sensitivity when amplifying up to 100 fg of the pathogen's genetic material ⁷
Universal oligonucleotide design (U1, U2) based on a region of the 28S rRNA gene specific probes for 21 fungal pathogens, including <i>C. immitis</i>	U1 and U2 oligonucleotides showed a sensitivity of 0.2 DNA genomes of <i>C. immitis</i> and the probes were 100% specific as they did not show false positive results ¹¹
Probes (C1 and C2) designed based on the ITS sequence of rDNA from <i>C. immitis</i>	The oligonucleotides C1 and C2 amplify a 239-bp fragment and were useful in the presumptive identification of <i>C. immitis</i> isolates in 720 soil samples ¹²
Oligonucleotides (Cocci I, Cocci II, Cocci III and IV) and probes (Cocci-HP-1 and Cocci-HP-2) specific for <i>C. posadasii</i> were designed based on the sequence of a gene (<i>Ag2/PRA</i>) encoding a unique immunoreactive protein <i>C. posadasii</i>	Molecular markers designed by the authors ¹ were used in nested PCR and real time PCR methods, showing a specificity of 100% and sensitivity of 1 fg, equivalent to 10 genome copies
Specific probes (C1 and C2) designed by Greene et al. ¹⁹	The oligonucleotides C1 and C2 were specific for detecting <i>C. immitis</i> in the serum samples of mice experimentally infected with the fungus and human serum with added DNA <i>Coccidioides</i> . The sensitivity was 100 fg of DNA, equivalent to 323 copies of the <i>C. immitis</i> genome ¹¹
Chemiluminescent DNA probe (Accuprobe) assays developed by Gen-Probe, Inc. (San Diego, CA)	The chemiluminescent probe hybridization with nucleic acids from a culture of <i>Coccidioides</i> from a bronchoalveolar lavage was useful in confirming the identity of the pathogen ¹
Diversi-Lab system (Bacterial Barcodes, Inc., Athens, GA) for the identification of <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>B. dermatitidis</i> , and <i>Coccidioides</i>	The Diversi-Lab system is based on the amplification of multiple repetitive sequences between 30 and 500-bp, interspersed in the genome of the dimorphic fungi and adequately identifies <i>Coccidioides</i> cultures ²³
Probes (Coi9-1F and Coi9-1R) designed from the contig 2.2 <i>C. immitis</i> sequence	Oligonucleotides amplify a 720-bp fragment in <i>C. immitis</i> and 634-bp in <i>C. posadasii</i> due to a deletion of 86-bp in the amplified region. This molecular marker is specific for <i>Coccidioides</i> and useful for distinguishing between <i>C. immitis</i> and <i>C. posadasii</i> ¹¹
Probes designed by Pan and Cole ²	The authors demonstrated the usefulness of the molecular marker in the identification of <i>C. immitis</i> in cultures ¹
Universal probes derived from the region ITS3 and ITS4	The authors propose that amplification with the ITS3 and ITS4 universal oligonucleotides is a strategy that can be diagnostic. Unambiguous identification of the two species proved to be possible by amplifying and sequencing the ITS region ¹¹
Probes designed based on the sequence of the <i>MBP-1</i> and the <i>SOWgp82</i> genes	Oligonucleotides designed based on the sequence of <i>MBP-1</i> gene to identify <i>C. immitis</i> and <i>C. posadasii</i> . A pair of oligonucleotides was designed based on the gene sequence <i>SOWgp82</i> to uniquely identify <i>C. posadasii</i> ¹¹
Probe designed from the ITS2 region of <i>Coccidioides</i>	These markers, used in real-time PCR, show high sensitivity for detecting <i>Coccidioides</i> spp. in respiratory specimens, fresh tissue and tissue preserved in paraffin obtained from patients with coccidioidomycosis ¹
Probes designed by Bialek et al. ⁶	The authors used the molecular markers obtained by Bialek et al. ⁶ to perform the diagnosis of pericarditis due to <i>Coccidioides</i> in combination with microbiological and serological methods ¹
Probes obtained from the <i>C. immitis</i> sequence of the 28S rDNA	These markers amplified a 375-bp specific band and are sufficiently sensitive to detect via semi-nested PCR, the DNA of <i>Coccidioides</i> isolates in soil samples ¹²

hampered their implementation is that only a few of these methods are commercially available, and some involve laborious methods, such as PCR-RFLP. In most clinical laboratories, experienced personnel are required, which makes these molecular tools accessible only in research laboratories. Therefore, the use of these tools must become widespread so that each clinical laboratory can decide how to integrate molecular methods into their standard identification practices.^{25,26}

Moreover, the use of molecular methods to identify organisms is based on the assumption that strains belonging to the same species show less genetic variation than organisms that are less closely related.²³ However, this is not true for *Coccidioides* or other pathogenic fungi because genetic variability has been shown to exist among isolates from different geographic regions, although their sexual state has not been described. Molecular markers to be used for the detection of pathogens from clinical samples should be designed from autochthonous isolates in the region in which they are to be used.

The molecular markers for the identification of *C. immitis* and *C. posadasii* that have been described to date are specific and sensitive; however, they must be validated to determine their applicability for diagnosis. The validation of these markers is important because they have been designed using clinical isolates from a single geographic region, which is

inconvenient because the genetic variability between isolates of the fungus from different countries could lead to false results, as has occurred in other fungi. The use of molecular markers to identify *Coccidioides* spp. will not replace the use of conventional tests but will provide fast and reliable results.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This paper is a partial fulfillment of the requirements of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). EDE acknowledges the support from the Program in Biological Sciences. This project was funded by PAPIIT-DGAPA (IN215509-3).

References

1. Aanensen DM, Spratt BC. The multilocus sequence typing network: mist.net. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W728–33.
2. Alvarez-Pérez S, García ME, Blanco JL. Diagnóstico micológico: algo está cambiando. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:638–46.

3. Assi MA, Binnicker MJ, Wengenack NL, Deziel PJ, Badley AD. Disseminated coccidioidomycosis in a liver transplant recipient with negative serology: use of polymerase chain reaction. *Liver Transpl.* 2006;12:1290–2.
4. Barker BM, Jewell KA, Kroken S, Orbach MJ. The population biology of *Coccidioides* epidemiological implications for disease outbreaks. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1111:147–63.
5. Bezerra CCF, de Lima RF, Lazera MS, Wanke B, Borba CM. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:241–4.
6. Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Ceceñas L, Reischl U, et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich Antigen. *J Clin Microbiol.* 2004;42:778–83.
7. Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfiel SL, et al. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2007;45:173–8.
8. Brilhante RS, Cordeiro RA, Rocha MF, Fachine MA, Furtado FM, Nagao-Dias AT, et al. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. Case report. *J Med Microbiol.* 2008;57:1288–92.
9. Burt A, Carter DA, Koenig GL, Whites TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:770–3.
10. Burt A, Carter DA, White TJ, Taylor JW. DNA sequencing with arbitrary primer pairs. *Mol Ecol.* 1994;3:523–5.
11. Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Mol Ecol.* 1997;6:781–6.
12. De Macêdo RC, Rosado AS, da Mota FF, Cavalcante MA, Eulálio KD, Filho AD, et al. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiol.* 2011;11:108 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/108>
13. Dong Y, Zhu H. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med.* 2005;108:149–57.
14. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004;5:435–45.
15. Fisher FS, Bultman MW, Johnson SM, Pappagianis D, Zaborsky E. *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States. A matter of scale. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1111:47–72.
16. Fisher MC, Koenig GL, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia.* 2002;94:73–84.
17. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Pathogenic clones versus environmentally driven population increases: analysis of an epidemic of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:807–13.
18. Frias De León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes MR. Development of specific SCAR markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 2012;50:673–9.
19. Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor JW. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia.* 2000;92:406–10.
20. Johnson SM, Simmons KA, Pappagianis D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1982–5.
21. Koufopanou V, Burt A, Szaro T, Taylor JW. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol Biol Evol.* 2001;18:1246–58.
22. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:5478–82.
23. Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:8414.
24. Kumar P, Gupta VK, Misra AK, Modi DR, Pandey BK. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *POJ.* 2009;2:141–62.
25. Neafsey DE, Barker BM, Sharpton TJ, Stajich JE, Park DJ, Whiston E, et al. Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Res.* 2010;20:938–46.
26. Padhye AA, Smith G, Standard PG, McLaughlin D, Kaufman L. Comparative evaluation of chemiluminescent DNA probe assays and exoantigen tests for rapid identification of *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol.* 1994;32:867–70.
27. Pan S, Cole GT. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. *Infect Immun.* 1995;63:3994–4002.
28. Pappagianis D, Einstein H. Tempest from Tehachapi takes toll or *Coccidioides* conveyed aloft and afar (Medical Information). *West J Med.* 1978;129:527–30.
29. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2977–82.
30. Pounder JI, Simmons KE, Barton CA, Hohmann SL, Brandt ME, Petti CA. Discovering potential pathogens among fungi identified as nonsporulating molds. *J Clin Microbiol.* 2007;45:568–71.
31. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infection. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2913–9.
32. Sharpton TJ, Stajich JE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jordan VS, et al. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res.* 2009;19:1722–31.
33. Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000;31:21–32.
34. Tintelnot K, De Hoog GS, Antweiler E, Losert H, Seibold M, Brandt MA, et al. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol.* 2007;45:385–93.
35. Tkachenko GA, Grishina MA, Antonov VA, Savchenko SS, Zamaraev VS, Lesovoi VS, et al. Identification of the agents of coccidioidomycosis using polymerase chain reaction. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.* 2007;25–31.
36. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1859–62.
37. Vignal A, Milan D, San Cristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol.* 2002;34:275–305.
38. Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 1994;32:3040–2.