



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Identificación de patrones proteicos de aislados clínicos de  
*Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii***

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**DÍAZ LUNA CÉSAR ALEJANDRO**

DIRECTORA: DRA. ESPERANZA DUARTE ESCALANTE

ASESOR INTERNO: JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

CIUDAD DE MÉXICO, 2017



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Clave: IN217415.

A la M. en C. Gabina Arenas López, quién proporcionó apoyo técnico a lo largo de la realización del presente trabajo y que fue esencial en la culminación de la tesis. Gracias a sus consejos y dedicación férrea a la ciencia hizo todo lo que estuvo en sus manos para que pudiera terminar la parte experimental de este proyecto.

## **INDICE GENERAL**

	<b>Pág</b>
<b>RESUMEN</b>	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
Diagnóstico convencional	8
<b>MARCO TEÒRICO</b>	10
Epidemiología	10
Interacción huésped-parásito	12
Clasificación clínica de la coccidioidomicosis	13
Diagnóstico	14
Identificación molecular de <i>Coccidioides</i>	15
Antígenos para el diagnóstico de la coccidioidomicosis	16
Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos	20
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	22
<b>HIPÓTESIS</b>	23
<b>OBJETIVOS</b>	24
General	24
Particulares	24
<b>MÉTODOS</b>	24
Aislados	24
Caracterización fenotípica	26
Obtención de cultivos monospóricos	26

Macro y micromorfología	26
Tamaño de los conidios	27
Caracterización genotípica	27
Obtención de DNA	27
Identificación de especie para los aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	28
Secuenciación	29
Caracterización de antígenos de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	30
Obtención de exoantígenos	30
Doble inmunodifusión en gel de agarosa o análisis de Ouchterlony	30
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	31
Electroforesis SDS-PAGE	32
Western-blot	33
Análisis de datos	34
<b>RESULTADOS</b>	34
Macro y micromorfología	34
Tamaño de artroconidios	36
Caracterización genotípica	36
Extracción de DNA genómico	36
Identificación de especie para los aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	37
Preservación de los cultivos monospóricos de <i>Coccidioides</i> spp.	39
Caracterización de exoantígenos	39

Cuantificación de proteínas	40
Electroforesis SDS-PAGE	41
Western Blot	48
<b>DISCUSIÓN</b>	50
<b>CONCLUSIÓN</b>	52
<b>REFERENCIAS</b>	53

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla1.</b> Fuente y origen geográfico de los aislados y cepa de referencia de <i>Coccidioides</i> spp.	26
<b>Tabla 2.</b> Curva de Albúmina Sérica Bovina (BSA).	33
<b>Tabla3.</b> Tamaño de artroconidios de aislados de <i>Coccidioides</i> spp.	37
<b>Tabla 4.</b> Cuantificación de proteínas de los exoantígenos obtenidos de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	41
<b>Tabla 5.</b> Matriz de datos binarios de presencia/ausencia de bandas en los patrones electroforéticos de exoantígenos de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i> .	48

## RESUMEN

La coccidioidomicosis es una micosis causada por hongos del género *Coccidioides*, esta enfermedad es endémica en el suroeste de los Estados Unidos, norte de México, América Central y la zona árida precordillerana de América del Sur. La infección, tanto en humanos como en otros mamíferos, se produce por la inhalación de artroconidios del hongo y las manifestaciones clínicas pueden confundirse con las generadas por otras entidades nosológicas, lo que dificulta su diagnóstico. Tradicionalmente, el diagnóstico de la coccidioidomicosis consiste en la combinación de resultados de estudios de gabinete y de laboratorio. Los estudios de gabinete proporcionan un diagnóstico presuntivo, mientras que los procedimientos de laboratorio son necesarios para establecer la etiología de la enfermedad. El diagnóstico definitivo se realiza por el aislamiento del agente causal en muestras clínicas, pero resulta difícil en las primeras etapas de la enfermedad, porque el crecimiento del hongo es tardío, de manera que se hace 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 lo que el objetivo del presente estudio fue identificar patrones proteicos de antígenos, obtenidos de aislados clínicos de *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii* para diseñar un probable marcador molecular que pueda ser utilizado como herramienta diagnóstica para esta enfermedad.

Los aislados incluidos en el estudio fueron identificados a nivel de especie a través de la sonda diseñada por Bialek *et al.* (2004) y por inferencia filogenética. Asimismo, fueron caracterizados fenotípicamente por macro y micromorfología. Se obtuvieron antígenos crudos de los aislados de *C. immitis* y de *C. posadasii*, y para confirmar sus características antigénicas, fueron probados en inmunodifusión en gel. Los antígenos fueron cuantificados y probados en ensayos de SDS-PAGE unidimensional. Además, se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo primario (suero de paciente con coccidioidomicosis probada) y anticuerpo secundario Anti-IgG-conjugado a HRP (Horseradish peroxidase) por sus siglas en inglés y streptactin HRP, y para revelar se utilizó el sustrato Luminata TM Crescendo.

A nivel molecular se identificaron cinco aislados correspondientes a *C. immitis* y seis a *C. posadasii*, mientras que a través de la identificación fenotípica se reveló que todos los aislados presentaron las características morfológicas descritas para estas especies. La prueba de inmunodifusión permitió confirmar las características antigénicas de estas especies por la presencia de dos bandas de precipitación con suero de paciente con coccidioidomicosis probada. A través de SDS-PAGE, los antígenos mostraron diferentes patrones polimórficos con bandas entre 15-150 kDa. Mientras que los ensayos de Western blot revelaron que una banda común de 50 kDa, presente tanto en aislados de *C. immitis* como de *C. posadasii*, fue reconocida por suero de pacientes con coccidioidomicosis. Por lo que la obtención de una banda común de 50 kDa a partir de los antígenos crudos de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* y reconocida por suero de paciente con coccidioidomicosis probada, puede ser útil en el diseño de un marcador molecular para el diagnóstico de esta enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis o fiebre del Valle de San Joaquín es una enfermedad causada por hongos ascomicetos del género *Coccidioides*, en el que actualmente se reconocen dos especies con fenotipos casi idénticos, *C. immitis* y *C. posadasii* (Fisher *et al.*, 2002). Esta enfermedad es adquirida a través de la inhalación de artroconidios, principalmente por huéspedes inmunocompetentes que viven o visitan áreas endémicas. Una vez en el huésped, los artroconidios se convierten en esférulas que contienen gran cantidad de endosporas y cada una de éstas es capaz de dar origen a otra esférula, manteniendo de esta manera un ciclo de reproducción asexual. Los artroconidios y esférulas son las únicas estructuras de reproducción asexual de *Coccidioides* que se conocen, ya que la reproducción sexual en este hongo nunca ha sido observada, a pesar de que se ha revelado la presencia del loci MAT potencialmente funcional en su genoma (Fraser *et al.*, 2007; Fraser y Heitman, 2003; Mandel *et al.*, 2007).

La coccidioidomicosis destaca actualmente como una de las micosis endémicas más importantes de Norteamérica, no obstante, en algunos países de Iberoamérica, como Guatemala, Honduras, Venezuela, Colombia, Brasil y Argentina, existen zonas endémicas también de gran relevancia. Sin embargo, en estos países esta enfermedad no es una enfermedad de reporte obligatorio, de manera que los datos epidemiológicos de esta micosis siguen siendo escasos y se restringen a estudios retrospectivos y a la publicación de casos clínicos (de Aguiar-Cordeiro *et al.*, 2009; Baptista-Rosas y Riquelme, 2007; Borelli *et al.*, 1991; Canteros *et al.*, 2010; Domínguez-Cota *et al.*, 2001; Herrera *et al.*, 2006; Hideo-Togashi *et al.*, 2009; Laniado-Laborín *et al.*, 1991, Laniado-Laborín, 2007, 2007a; Méndez-Tovar *et al.*, 2007; Mondragón-González *et al.*, 2005; Reviákina *et al.*, 2002; Torres-Nájera *et al.*, 2006), por lo que su incidencia real se desconoce.

Por otro lado, la mayoría de las infecciones causadas por estos hongos, cursan como asintomáticas (60% de los casos aproximadamente) o con un cuadro clínico parecido a una gripe estacional-inespecífica con resolución espontánea, mientras que un 40% evoluciona a formas clínicas sintomáticas con cuadros respiratorios leves que pueden ser autolimitadas o resueltas con tratamientos específicos de

unas cuantas semanas o meses, o bien, pueden progresar hasta formas diseminadas graves (Johnson *et al.*, 2014).

### **Diagnóstico convencional**

Las manifestaciones clínicas de la coccidioidomicosis pueden ser confundidas con las generadas por otras entidades nosológicas, lo que dificulta su diagnóstico. Tradicionalmente, el diagnóstico se realiza considerando los resultados de estudios de gabinete (clínicos y radiológicos) y de laboratorio. Los estudios de gabinete como las radiografías de tórax, las imágenes por resonancia magnética o tomografía, usualmente proporcionan diagnóstico presuntivo que ayudan a orientar hacia un diagnóstico certero (Saubolle *et al.*, 2007), mientras que los procedimientos de laboratorio son necesarios para establecer la etiología de la enfermedad (Saubolle *et al.*, 2007a).

Dentro de los procedimientos de laboratorio, el diagnóstico convencional se ha fundamentado en la identificación del hongo mediante un examen directo en fresco o teñido con diferentes técnicas, y a través del cultivo de muestras de tejidos o fluidos. En el examen directo en fresco, con hidróxido de potasio de los materiales clínicos, la observación directa de esférulas es la forma de diagnóstico más rápida, pero su sensibilidad es baja y requiere de un observador experimentado.

*Coccidioides* spp. puede desarrollarse en medio de cultivo agar Sabouraud con y sin cicloheximida, además en medios de uso en bacteriología como agar sangre y chocolate (Moroyoqui-Navarro y Figueroa-Sauceda, 2008). Entre 3 y 5 días crece una colonia micelial, blanca y con el tiempo va cambiando a color grisáceo, tanto a 25-28°C como a 36-37°C y las observaciones microscópicas del cultivo permiten la identificación del género por la presencia de artroconidios intercalados en forma de barril de 2.5-4.3 x 3-8 µm a lo largo de la hifa. Asimismo, es importante diferenciar *Coccidioides* spp. de *Malbranchea* sp., ésta última, es saprófita con morfología similar, lo que hace necesario confirmar la identificación mediante la conversión dimórfica (Pan y Cole, 1995).

Además, otras técnicas son empleadas para evidenciar la presencia del agente etiológico o de sus productos en muestras del paciente, como es el análisis histopatológico de tejido, mediante el uso de diversas tinciones histológicas (H&E,

metenamina de plata, PAS, entre otras). La histopatología se realiza en cortes de tejidos criopreservados, o bien, fijados en paraformaldehído e incluidos en parafina, en donde se pueden observar esférulas con endosporas en su interior o libres en los tejidos, también se puede observar la presencia de hifas septadas y formas intermedias entre esférulas y artroconidios, particularmente en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, que desarrollaron coccidioidomicosis (Muñoz *et al.*, 2004; 2008). Entre las tinciones histológicas más específicas se encuentran las técnicas de inmunohistoquímica, donde la presencia del hongo puede ser evidenciada por la incubación con anticuerpo específico anti-*Coccidioides*, seguida de un sistema estreptavidina-biotina-peroxidasa y revelada con un cromógeno (Canteros *et al.*, 2009; Casal, 2008), no obstante uno de los inconvenientes es su interpretación, particularmente cuando se presentan formas parasíticas atípicas de *Coccidioides* spp., por lo que depende del muestreo adecuado, de la experiencia del observador y de la coloración histoquímica apropiada (Muñoz-Hernández *et al.*, 2008).

Actualmente, las pruebas serológicas son de gran utilidad en el diagnóstico de las infecciones causadas por *Coccidioides* spp., en el contexto de un síndrome clínico compatible. La prueba de inmunodifusión (ID) para la detección de anticuerpos IgG e IgM, es un ensayo común y permite determinar la exposición a *C. immitis*, con buena especificidad. Mientras que la prueba de Fijación de Complemento (FC) para detectar anticuerpos IgG específicos, es más útil en pacientes inmunocompetentes. El título de FC puede ser útil para monitorear la actividad de la enfermedad durante su desarrollo y puede convertirse en negativa con el control de la enfermedad a largo plazo. Títulos mayores de 1:16 en FC, aumenta la posibilidad de enfermedad diseminada. Mientras que en una infección temprana del paciente, los resultados serológicos pueden ser negativos. Las pruebas serológicas, generalmente se realizan con muestras de sangre, sin embargo la prueba también puede realizarse con otras muestras como líquido de articulaciones o líquido pleural. Con todo, es importante considerar que los ensayos serológicos son menos confiables en pacientes inmunocomprometidos, ya que del 20 al 50% de éstos dan pruebas negativas con estos métodos. En las formas de la enfermedad con un curso clínico más benigno, como pacientes con nódulos pulmonares aislados, confirmados por

cultivo o histopatología, las pruebas serológicas a menudo también pueden ser negativas (Carrada-Bravo, 2014).

A pesar de estos inconvenientes, la utilización de métodos inmunodiagnósticos, siguen siendo recomendable, no obstante que tienen limitaciones importantes, como su baja reproducibilidad y la reactividad cruzada, debido a que *Coccidioides* spp. comparte fracciones antigénicas con otros hongos que producen micosis en el hombre, además las técnicas desarrolladas para detectar respuesta a anticuerpos usan tradicionalmente, extractos crudos integrados por un gran número de componentes del hongo, lo que favorece la reactividad cruzada entre los anticuerpos de pacientes con diferentes infecciones de procedencia fúngica e incluso bacteriana. Esto ha propiciado, la obtención de antígenos puros con propiedades físico-químicas bien definidas para el diagnóstico de la coccidioidomicosis, de manera que varios investigadores han orientado sus trabajos hacia la purificación de fracciones antigénicas de la pared celular de *Coccidioides* spp., la cual está constituida fundamentalmente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano, mientras que las proteínas, generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas (Thompson *et al.*, 2012). Debido a que las moléculas de la pared celular de este hongo están localizadas en la superficie celular, que es el área de contacto entre el organismo y el huésped, varias de esas moléculas pueden estimular la respuesta inmune humoral y celular y son tradicionalmente usadas en el diagnóstico de la coccidioidomicosis.

## **MARCO TEÓRICO**

### **Epidemiología**

Las zonas endémicas de *Coccidioides* spp. incluyen el suroeste de los Estados Unidos, y abarcan los estados de Arizona, California, Nuevo México, Nevada, Utah, Washington y Texas. Además, México, Guatemala, Honduras, Venezuela, Brasil, Argentina y Paraguay, también tienen áreas endémicas para esta enfermedad (Hector y Laniado-Laborín, 2005).

En los Estados Unidos, la incidencia anual de la coccidioidomicosis es variable, pero en general es cada vez mayor, con una tasa que va de 5.3 por 100,000 habitantes en 1998, a una tasa de 42.6 en 2011 (CDC, 2013). La tasa de pruebas cutáneas positivas se encuentran en rangos de 50% hasta el 70% en el condado de Kern, incluyendo la ciudad de Bakersfield, y los condados vecinos Tulare y Kings. En comparación con *C. immitis*, *C. posadasii* tiene una región más amplia de endemicidad, desde el centro y el sur de Arizona al oeste de Texas y el sur de Nuevo México. La región más concentrada para *C. posadasii* es Arizona, donde la mayoría de las pruebas cutáneas y los casos de coccidioidomicosis positivos se producen en el Condado de Maricopa (incluyendo la ciudad de Phoenix), el Condado de Pima (incluyendo la ciudad de Tucson), y el condado de Pinal. También está presente, de manera esporádica, en sitios en el sur de Utah y Nevada (Brown *et al.*, 2013).

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 enfermedad 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 (Nuevo León, Tamaulipas, Baja California y Chihuahua, entre otros). Ésta es, hasta el momento, la referencia más importante sobre la distribución geográfica de las principales áreas endémicas en México (Baptista-Rosas y Riquelme, 2007).

En nuestro país, se han realizado 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 1,500 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 (Nguyen *et al.*, 2013). De manera que, los datos anteriores permiten sugerir a la coccidioidomicosis, en México, como una enfermedad emergente, debido al incremento de la tasa de infección registrada en los últimos años (Hector *et al.*, 2011).

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, de 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 más información acerca de esta enfermedad en este 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 también como una enfermedad emergente en el país.

### **Interacción huésped-parásito**

El encuentro inicial entre *Coccidioides* spp. y el huésped, inicia cuando los arthroconidios del hongo son inhalados por un huésped susceptible, que se encuentra o visita sitios endémicos, y éstos alcanzan los pulmones y alveolos. Asimismo, las células epiteliales del pulmón están equipadas con receptores de patrones de reconocimiento (PRRs), tales como receptores tipo Toll (TLRs) y dectina-1, que son capaces de inducir respuestas efectoras inmediatas, además estas células influyen en la regulación de los macrófagos alveolares. En los pulmones, las células inmunes innatas reconocen componentes del hongo a través de múltiples receptores, induciendo la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En cuestión de horas, *Coccidioides* induce una

afluencia de polimorfonucleares (PMN) activados, lo que a su vez, puede aumentar también la formación de esférulas. Los PMN responden de una manera similar a los macrófagos, es decir, envuelven a los artroconidios sin eliminarlos, ya que existen evidencias que indican que no se lleva cabo la fusión fagosoma-lisosoma, impidiendo que los artroconidios entren en contacto con las enzimas líticas de los PMN (Frey y Drutz, 1986). De manera que los artroconidios crecen y se transforman en esférulas inmaduras, y son éstas quienes inducen la fagocitosis y la producción de ROS, TLR-2 y dectina-1, además inducen cascadas de señales mediadas por MyD88 y adaptadores intracelulares, que llevan a la activación del factor de transcripción NFκB, que produce citocinas proinflamatorias como, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2) e interleucina 6 (IL-6), que son efectores esenciales de la respuesta celular Th1 y Th17. La Dectina-1 también media la producción de citocinas Th1 y citocinas Th17, IL-23, IL-17A, IL-22, IL-12 e interferón (IFN). Además, las esférulas aumentan la expresión del RNAm y otros factores para la evasión en el huésped. En los siguientes días (días dos o tres), las esférulas se someten a una división nuclear libre, y maduran en células de gran tamaño (30 a 80 μm) tabicadas que contienen endosporas en desarrollo. Estas esférulas son demasiado grandes para ser fagocitadas, además producen una matriz extracelular (ECM) alcalina que impide el contacto con PMN. En el cuarto o quinto día, las esférulas maduras se rompen para liberar endosporas. Una respuesta del huésped consiste en atraer PMN y macrófagos, los cuales fagocitan fácilmente a las endosporas. Sin embargo, la fagocitosis puede tener algunos inconvenientes, ya que las endosporas pueden permanecer en grandes racimos unidas por estructuras fibrilares procedentes de la pared exterior de la esférula y están protegidas por la ECM. A partir de este momento, continúa el ciclo parasitario del hongo en el huésped (Stockamp y Thompson, 2016).

### **Clasificación clínica de la coccidioidomicosis**

La coccidioidomicosis puede causar un espectro clínico heterogéneo, sin embargo de manera general se puede clasificar en enfermedad primaria y secundaria. La enfermedad primaria generalmente afecta a los pulmones, que es el sitio más común, y en este caso, se adquiere por inhalación directa de los artroconidios del

hongo. Por otro lado, la enfermedad secundaria puede afectar a los pulmones y llega a ser un proceso crónico. Asimismo, la enfermedad diseminada (generalmente como resultado de la diseminación hematológica a partir de una infección pulmonar primaria) puede involucrar varios órganos, entre estos: la piel, los huesos, las articulaciones, el sistema nervioso y las meninges (García *et al.*, 2015).

Por otro lado, la amplitud en el espectro de esta enfermedad está predominantemente asociado a las defensas del huésped, el tamaño del inóculo, y posiblemente a la virulencia del hongo o de otros factores que aún no se conocen bien. Los síntomas generalmente comienzan entre 7 a 21 días después de la inhalación de los artroconidios del hongo. Los pacientes sintomáticos se quejan de fiebre, tos, dolor en el pecho, fatiga y malestar general. El 20% de los pacientes con neumonía primaria coccidioidal, se asocia con dolor de cabeza. Los síntomas generalmente duran menos de 3 semanas, aunque la fatiga prolongada puede ser prominente, las manifestaciones cutáneas transitorias, incluyendo erupción cutánea y eritema nodoso, puede observarse en el 10-50% de los pacientes. Asimismo, alrededor del 25% de los casos de enfermedad pulmonar aparecerá con síntomas similares a neumonías, incluyendo dolor pleurítico, tos no productiva, fiebre, artralgias y mialgias. La coccidioidomicosis diseminada se estima que ocurre en menos de 5% de los pacientes sintomáticos y probablemente en menos del 1% de todas las infecciones. Los pacientes de raza negra o asiática (especialmente Filipinos), las mujeres embarazadas en el tercer trimestre, y cualquier paciente inmunocomprometido parecen estar en riesgo significativo para contraer la enfermedad diseminada (Saubolle *et al.*, 2007).

### **Diagnóstico**

Se sabe que las manifestaciones clínicas de la coccidioidomicosis pueden ser confundidas con otras entidades nosológicas, como la histoplasmosis y la tuberculosis, lo que dificulta su diagnóstico, por lo que es necesario realizar un diagnóstico rápido y confiable para brindar un tratamiento oportuno a los pacientes afectados por esta micosis.

Como se ha mencionado antes, el diagnóstico de la coccidioidomicosis se realiza con base en los resultados de una combinación de datos clínicos, estudios de

gabinete y de laboratorio. Sin embargo, 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 inconvenientes han propiciado el desarrollo de métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la presencia del agente etiológico o de sus productos, en muestras del paciente, como son las pruebas moleculares.

### **Identificación molecular de *Coccidioides***

Una de las primeras sondas moleculares, fue diseñada con base en una subunidad pequeña (SSU) del rDNA que permitió reconocer el género *Coccidioides* (Greene *et al.*, 2000) y discriminarlo de hongos morfológicamente similares del orden Onygenales (Pan y Cole, 1995).

Por otro lado, 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 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.

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 mostraron que de todos estos oligonucleótidos probados, sólo los ITS3 y 4 diferenciaron las dos especies.

Recientemente, Duarte-Escalante (2013) obtuvo un marcador SCAR, generado por AFLP, para detectar *Coccidioides* spp., este marcador resultó ser específico y sensible, sin embargo no ha sido probado en muestras clínicas.

Estos antecedentes muestran que, a pesar del desarrollo de varios marcadores moleculares, obtenidos a través de la implementación de diversas estrategias, ninguno ha sido estandarizado para ser utilizado en el diagnóstico clínico de la coccidioidomicosis en la práctica cotidiana.

### **Antígenos para el diagnóstico de la coccidioidomicosis**

Desde hace varios años se han utilizado procedimientos inmunológicos como herramienta alternativa para el diagnóstico de la coccidioidomicosis, a pesar de presentar algunas limitaciones, como reacciones cruzadas con otras especies de hongos causantes de cuadros clínicos semejantes, de manera que se han desarrollado diversos antígenos para ser utilizados en el diagnóstico de esta enfermedad.

Los principales antígenos de *Coccidioides* spp. han sido purificados a partir de la pared celular y de extractos metabólicos que son productos celulares segregados al medio de cultivo. Smith *et al.* (1956), fueron de los primeros en utilizar extractos metabólicos de *C. immitis*, ya que durante la Segunda Guerra Mundial tuvieron la oportunidad de documentar, mediante estudios clínicos e inmunológicos, 39,500 infecciones por *C. immitis* en los campos de aviación situados en el sur de California; asimismo demostraron la utilidad de las pruebas cutáneas y serológicas con coccidioidina, y establecieron el uso de las pruebas de precipitación en tubo (TP) y la fijación del complemento (FC) para el diagnóstico de esta micosis.

Posteriormente, Levine *et al.* (1961, 1973) utilizaron un antígeno de esférulas de *Coccidioides* llamado esferulina en encuestas epidemiológicas realizadas en los EE. UU. y México y efectuaron los primeros ensayos de vacunación preventiva.

Kaufman y Standard (1978) establecieron que *Coccidioides* produce un exoantígeno termoestable que es específico para este hongo. Este antígeno estuvo presente en filtrados de cultivo de todos los aislados de *Coccidioides* examinados y no se detectó en extractos derivados de hongos heterólogos, incluyendo patógenos como *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis*. Asimismo, Cox y Britt (1986) purificaron un exoantígeno y obtuvieron un antisuero monoespecífico. Cuando lo examinaron por inmunoelectroforesis, el exoantígeno fue identificado

como antígeno 11 y se encontró en filtrados de cultivo tanto de micelio como de cultivo de micelios lisados con tolueno. Mientras que, Pan y Cole (1995) reportaron la clonación del gen que codifica este antígeno-específico de *Coccidioides* (CSA) y establecieron que el antígeno es una serina proteinasa de 19 kDa.

Galgiani *et al.* (1992) aislaron un componente proteico inmunorreactivo de 33 kDa, a partir de una glicoproteína de la pared de esférulas maduras de *C. immitis*. Esta proteína parece ser distinta del antígeno que detecta anticuerpos en la prueba de FC, y podía detectar anticuerpos coccidioidales antes que los antígenos convencionales. Los autores también describen el uso de una prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-33 kDa en muestras humanas de suero. Dugger *et al.* (1991), estudiaron la proteína de 33-kDa y mostraron que tenía identidad antigénica con el antígeno Ag2 cuando se analizó por inmunoelectroforesis de dos dimensiones, en conjunto con la coccidioidina y fue reactivo con un anticuerpo monoclonal IgG2a, específico para Ag2 (Cox *et al.*, 1993). El análisis de aminoácidos del péptido de 33-kDa reveló un contenido de prolina (17%) y treonina (15%). Por inmunomicroscopía, usando anticuerpos humanos purificados por afinidad, revelaron que el antígeno se localiza en la pared interna de la célula y anclado en los planos de desarrollo de las esférulas. En preparaciones de endosporas, el antígeno de 33-kDa parecía estar expuesto en la superficie de la pared y la interconexión del glicocalix. Casi simultáneamente con la clonación de Ag2, realizada por Zhu *et al.* (1996, 1996a), Dugger *et al.* (1996) clonaron el gen que codifica el péptido de 33-kDa y los análisis de secuencia de DNA revelaron un marco de lectura abierto (ORF) de 582-bp que codifica una proteína de 194 aminoácidos con un peso molecular de 19.5 kDa. La composición de aminoácidos deducida mostró un alto contenido en prolina y treonina (12.9 y 11.3% mol, respectivamente) y sobre esa base, el péptido 33-kDa fue nombrado "antígeno rico en prolina" (PRA).

Otro antígeno descrito es la  $\beta$ -glucosidasa termoestable de 120-kDa, esta enzima está presente en el medio de cultivo y en la pared de las células parasíticas jóvenes (esférulas pre-segmentadas) y se utilizó para la PT (Hung *et al.*, 2001), mientras que para la FC, el antígeno que se utilizó es una quitinasa lábil al calor (Johnson y

Pappagianis, 1992). Las pruebas de PT y FC son variantes de estos ensayos y se incorporó la inmunodifusión (ID) en agar. Todas son muy específicas y han revelado ser relativamente sensibles. Los ensayos de PT detectan una inmunoglobulina M y son positivas al inicio de la enfermedad y a veces, durante la reincidencia. Los ensayos de FC son positivos, por lo general después de 2-3 semanas de la enfermedad, detectan anticuerpos de tipo IgG, y sus títulos tienen implicaciones con el pronóstico, por ejemplo, altos títulos sugieren una enfermedad grave o diseminada, mientras que en las personas que resuelven la enfermedad, ambas reacciones se vuelven negativas con el tiempo.

Asimismo, desde la década de 1990, el ensayo inmunoenzimático (EIA Premier, Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, OH, EE.UU.) ha sido ampliamente empleado en la región endémica de Estados Unidos. Martins *et al.* (1995), inicialmente compararon este ensayo con la prueba de PT y con los ensayos de la FC, así como con la aglutinación en látex (ensayo menos específico). Los resultados, mostraron que la especificidad fue del 98.5% y la sensibilidad fue del 95.5%. Kaufman *et al.* (1995), examinaron muestras clínicas con casos confirmados de coccidioidomicosis y encontraron que todas fueron positivas por ELISA IgM o IgG, sin embargo, hubo baja reactividad en muestras de pacientes con otras infecciones pulmonares. Blair *et al.* (2006), examinaron pacientes inmunocomprometidos y encontraron, que las pruebas serológicas fueron menos tendientes a ser positivas que entre los pacientes inmunocompetentes. Posteriormente, examinaron pacientes utilizando la reacción de inmunoensayo enzimático (EIA) IgM y confirmaron el diagnóstico de coccidioidomicosis. Aunque, hay preocupación sobre la especificidad de la Premier EIA, en particular la IgM, los informes publicados sugieren que es una prueba sensible (Blair y Currier, 2008).

También se han desarrollado pruebas para detectar antígeno coccidioidal circulante (Galgiani *et al.*, 1984; Wack *et al.*, 1988; Weiner, 1983), desafortunadamente, estos nunca alcanzaron la sensibilidad requerida para el diagnóstico clínico. Sin embargo, Kuberski *et al.* (2007) reportaron varios casos de coccidioidomicosis que resultaron ser positivos con un kit comercial para la detección de galactomananas para *H. capsulatum*. Este hallazgo propició el desarrollo de una prueba específica para

*Coccidioides* (Durkin *et al.*, 2008). Para desarrollar esta prueba, se obtuvieron anticuerpos en conejos inmunizados con galactomanas que fueron utilizados en la prueba de EIA. El ensayo detecta 0.03 ng/mL de galactomanano en pacientes con coccidioidomicosis, particularmente con algún tipo de inmunosupresión y enfermedades graves, sin embargo presenta reactividad cruzada con otras micosis. Brillhante *et al.* (2008), describieron el uso de un antígeno potencial producido a partir de una única cepa de *C. posadasii* para el diagnóstico serológico de esta enfermedad. Además, mostraron que es posible emplear un antígeno casero cuando un resultado falso negativo es obtenido a partir del uso de un antígeno comercial ampliamente utilizado.

Filho *et al.* (2012), evaluaron la reactividad de un antígeno casero, extraído de una cepa de *C. posadasii* aislada en el noreste de Brasil. Para evaluar su reactividad y especificidad usaron inmunodifusión radial y Western blot y establecieron su caracterización bioquímica por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE). Observaron buena reactividad y especificidad con las dos técnicas de inmunodiagnóstico, además en SDS-PAGE, observaron dos bandas bien definidas correspondientes a  $\beta$ -glucosidasa y glutamina sintetasa, por lo que los autores los proponen como una herramienta de diagnóstico rápida y de bajo costo y sin el riesgo de manipulación directa del microorganismo.

Actualmente, de Aguiar Cordeiro *et al.* (2013) describieron la preparación de antígenos (F0-90 y F60-90) para la detección de anticuerpos coccidioidales humanos mediante ID y EIA. Los antígenos se ensayaron frente a muestras de suero de pacientes con coccidioidomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis, así como de individuos sanos. La reactividad más alta en las pruebas de ID se observó con el antígeno F0-90, mientras que por EIA, los mejores resultados se obtuvieron con el antígeno F60-90. Por lo que los autores sugieren el uso comercial de los antígenos F0-90 y F60-90 para el diagnóstico presuntivo de coccidioidomicosis por ID o EIA, respectivamente.

Por otro lado, para el diagnóstico molecular se ha recurrido a la tecnología del DNA recombinante con el propósito de aumentar la confiabilidad y el rendimiento que se han descrito para *Coccidioides* spp. está el antígeno coccidioidal de FC que es una

quitinasa que se puede aislar de los filtrados del cultivo de esférulas endoesporulantes y de hifas de *C. immitis*. El gen que codifica este antígeno se clonó y se obtuvo un antígeno recombinante funcional FC (rCF) que corresponde a una quitinasa de 47 kDa (Zimmermann *et al.*, 1996). Este antígeno ha mostrado una sensibilidad del 96.9% y una especificidad del 100% en la prueba de ELISA (Johnson *et al.*, 1996). El rCF también fue más eficaz en distinguir los niveles de anticuerpos de pacientes con coccidioidomicosis pulmonar que en sueros de pacientes con diseminación de la enfermedad (Yang *et al.*, 1997). Los mayores títulos fueron observados en pacientes con enfermedad diseminada, lo que sugiere que este método de diagnóstico podría distinguir entre coccidioidomicosis pulmonar y coccidioidomicosis invasiva. Sin embargo, este antígeno comparte un epítipo con *H. capsulatum* y *B. dermatitidis* (Yang *et al.*, 1997). Otro antígeno específico para *Coccidioides* spp. es el antígeno rico en prolina (Ag 2/PRA) o antígeno 2 obtenido por la deglicosilación de un extracto de esférulas y ha sido evaluado favorablemente, en ratón, como candidato para una vacuna (Peng *et al.*, 1999; Herr *et al.*, 2007). El gen que codifica este antígeno se clonó y el antígeno recombinante (rPRA) obtenido, reconoce anticuerpos IgG de pacientes con coccidioidomicosis pulmonar progresiva o extrapulmonar, además mostró alta sensibilidad (88%) y especificidad (97%) en el diagnóstico de coccidioidomicosis (Orsborn y Galgiani, 1998). La producción de antígenos recombinantes, provee una fuente de antígenos reproducibles bien definidos que se pueden emplear como reactivos en diferentes métodos inmunológicos, tales como ID, ELISA o Western Blotting (WB) para el diagnóstico de la coccidioidomicosis, otra herramienta importante es la obtención de anticuerpos monoclonales contra estos antígenos para la detección de antígeno en pacientes inmunosuprimidos (Cox *et al.*, 1993).

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos**

La electroforesis es una herramienta que se utiliza para la separación, identificación y purificación de proteínas. En un principio se utilizaron geles de almidón, pero posteriormente se reemplazaron por geles de poliacrilamida, impartiendo a las proteínas una carga negativa, misma que ocasiona que migren al ánodo de un

circuito eléctrico. El principio que se utiliza en electroforesis se fundamenta en la atracción de cargas eléctricas. Cuando una proteína presenta una carga eléctrica neta, en un campo eléctrico se desplazará al electrodo con carga contraria. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida será la migración. La electroforesis, es un método analítico –semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. Inicialmente, se emplearon como soporte para la electroforesis, un gel de poliacrilamida (PAGE). Posteriormente, se utilizó dodecil sulfato de sodio (SDS), como agente reductor para la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) (García-Pérez, 2000).

El fundamento de esta técnica es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. El fundamento fisicoquímico se basa en que la velocidad de migración ( $v$ ) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva ( $q$ ) y el gradiente de potencial eléctrico ( $E$ ) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción ( $f$ ) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E/f$$

La movilidad electroforética ( $Me$ ) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la

carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis (García-Pérez, 2000).

El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética. La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. El pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo (Shapiro *et al.*, 1967; García-Pérez, 2000).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

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. 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. Baja California presenta alta prevalencia entre la población pediátrica, estudios realizados en Tijuana, muestran un 10% de reactores a la coccidioidina. 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, como es el caso de la tuberculosis que también predomina en estas zonas endémicas. La

coccidioidomicosis destaca actualmente como una de las micosis endémicas más importantes de Norteamérica, no obstante, en algunos países de Iberoamérica, como Guatemala, Honduras, Venezuela, Colombia, Brasil y Argentina, existen zonas endémicas también de gran relevancia. Sin embargo, en estos países, la coccidioidomicosis no es una enfermedad de reporte obligatorio, de manera que los datos epidemiológicos de esta micosis siguen siendo escasos y se restringen a estudios retrospectivos y a la publicación de casos clínicos, por lo que su incidencia real se desconoce. Tradicionalmente, el diagnóstico de la coccidioidomicosis se realiza considerando los resultados de estudios de gabinete (clínicos y radiológicos) y de laboratorio. Los estudios de gabinete como las radiografías de tórax, las imágenes por resonancia magnética o tomográficas, usualmente proporcionan un diagnóstico presuntivo que ayudan a orientar hacia el diagnóstico de certeza, mientras que los procedimientos de laboratorio son necesarios para establecer la etiología de la enfermedad. Dentro de los procedimientos de laboratorio, el diagnóstico convencional de la coccidioidomicosis se ha fundamentado en la identificación del hongo mediante un examen directo en fresco o teñido con diferentes técnicas y en el cultivo de muestras de tejidos o fluidos. Tales inconveniencias hacen necesario recurrir a métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la presencia del agente etiológico en muestras clínicas.

## **HIPÓTESIS**

A partir de exoantígenos obtenidos de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* examinados por SDS-PAGE, se obtendrán patrones proteicos que evidenciaran bandas diferenciales que permitirán la identificación entre las dos especies en muestras clínicas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los patrones proteicos obtenidos por SDS-PAGE, para identificar las especies *Coccidioides* spp. y evaluar su especificidad y sensibilidad frente a muestras clínicas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Caracterizar fenotípicamente (macro y micromorfología) los aislados de *Coccidioides* spp.

Identificar la especie de los aislados incluidos en el estudio, pertenecientes al género *Coccidioides*, utilizando la sonda reportada por Bialek *et al.* (2004).

Obtener cultivos monospóricos de los aislados de *Coccidioides* spp.

Obtener exoantígenos crudos de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*.

Identificar fracciones antigénicas de los exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii* por SDS-PAGE unidimensional.

Probar en Western-blot la especificidad de los exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii* con muestras clínicas.

## **MÉTODOS**

### **Aislados**

Se utilizaron 11 aislados clínicos de *Coccidioides* spp., nueve aislados procedentes de México y dos aislados procedentes de Argentina. Los aislados y cepas se preservaron en frascos con agua estéril a 4°C y en tubos con agar-Mycobiotic (Bioxón, México, MX) con y sin aceite mineral, a 4°C. Todos los procedimientos de este estudio se llevaron a cabo en un área de bioseguridad clase 3. 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.

<b>Aislado</b>	<b>Fuente</b>	<b>Origen Geográfico</b>
HU1 <sup>a</sup>	ND	Monterrey, MX
073129 <sup>b</sup>	Biopsia de pie	Salta, AR
083376 <sup>b</sup>	LBA	Catamarca, AR
30.1(1) <sup>c</sup>	Esputo	Tijuana, Baja California Norte**
43.3 <sup>c</sup>	Esputo	Guerrero****
62 <sup>c</sup>	Esputo	ND
GGM <sup>c</sup>	Esputo	Baja California Norte
ZVJ <sup>c</sup>	Nódulo pulmonar	Michoacán, Tomatlán, Vellavista
QR <sup>c</sup>	Punción de rodilla	ND
PRA <sup>c</sup>	Lavado branquial	Tijuana, Baja California norte
M40-05 <sup>d</sup>	Secreción de herida	Guadalajara, MX

<sup>a</sup>Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León; <sup>b</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; <sup>c</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Ismael Cosío Villegas"; <sup>d</sup>Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud; LBA-lavado broncoalveolar; ND-no determinado; MX-México; AR-Argentina.

## **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA**

### **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 se diluyó 1:1000 y se tomó 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.

### **Macro y micromorfología**

Los aislados de *Coccidioides* spp. se sembraron en cajas de Petri con medio agar micobiótico (Bioxon) a 30°C durante 15 días, a lo largo del período de crecimiento se observaron las características macroscópicas de cada cultivo (color, tamaño y textura de la colonia). Se realizaron exámenes en fresco, utilizando azul de algodón para observar las características microscópicas (forma de hifas, presencia de arthroconidios) en un microscopio óptico (Olympus America Inc., USA) con un objetivo de 40X y se registraron a través de una cámara digital Cyber-shot 8.1 megapíxeles (Sony Inc., Japan).

### **Tamaño de los conidios**

Los cultivos fueron crecidos en agar micobiótico (Bioxon), 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 cubrió con 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.).

## **CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA**

### **Obtención de DNA**

Se obtuvo a partir del desarrollo de los cultivos de *Coccidioides* spp. en tubos de 50 mL con medio líquido YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa), con agitación constante e incubados a temperatura ambiente durante 15 días. Posteriormente se filtró el micelio, utilizando papel filtro Whatman No. 1. Para el rompimiento del micelio del hongo, se utilizó el método propuesto por Duarte-Escalante et al. (2013) de la siguiente manera: se tomaron aproximadamente 100 mg de masa micelial húmeda y se depositaron en microtubos de 2 mL que contenían 0.2 g de perlas de vidrio (400 a 455 µm de diámetro lavadas previamente con ácido clorhídrico) y se adicionaron 400 µL de amortiguador de extracción AP1. Los tubos se colocaron en el equipo FastPrep® -24 Instrument (MP Biomedicals, California, USA) para el rompimiento del micelio, se utilizó un esquema de 4 períodos de 40 s a una velocidad de 6 m/s, colocando los tubos en hielo durante 5 min entre cada período. Posteriormente, la extracción de DNA genómico se llevó a cabo con el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, GE) como sigue: Al tubo que contenía el micelio pulverizado se adiciono 4 µL de RNAsa (100 mg/mL), y se incubo la mezcla durante 10 min a 65°C, mezclando 2 ó 3 veces por inversión. Luego se adiciono 130 µL del amortiguador AP2 y se incubó por 5 min en hielo, después los tubos se centrifugaron 5 min a 13,200 rpm. Se transfirieron 450 µL del sobrenadante a la columna QIAshredder mini spin sostenida en un tubo colector de 2

mL y se centrifugo a 13,200 rpm por 2 min. Se midió el volumen del sobrenadante obtenido y se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 1.5 volúmenes del amortiguador AP3/E. Se colocaron 650  $\mu$ L de esta mezcla en una columna DNeasy mini spin sostenida en un tubo colector de 2 mL y se centrifugo 1 min a 9,000 rpm, desechando el sobrenadante obtenido, se repitió este paso hasta filtrar todo el volumen. Posteriormente, la columna se cambió a otro tubo colector, y se realizó un lavado con 500  $\mu$ L del amortiguador AW, centrifugando 1 min a 9,000 rpm, se repitió la centrifugación para eliminar el amortiguador. Por último, la columna se colocó en un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 mL, adicionando a la columna 100  $\mu$ L de agua MilliQ, y dejando incubar durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo por 1 min a 9,000 rpm para eluir. Finalmente, se realizó una segunda elución, pero con 50  $\mu$ L de agua MilliQ.

La concentración de DNA fue determinada por espectrofotometría en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Inc., USA) a 260-280 nm y confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, comparando con las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 ng del fago  $\lambda$  (Gibco BRL Life Technology, Grand Island, NE). Los geles se tiñeron con GelRed™ (Biotium, CA, US) a una concentración de 10,000X. Posteriormente, todos los DNAs se diluyeron a una concentración final de 10 ng/ $\mu$ L en agua Milli Q para su uso. El DNA genómico de cada aislado fue almacenado a 4°C.

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

Para la identificación de los aislados de *Coccidioides* spp., a nivel de especie, se utilizó el método descrito por Bialek *et al.* (2004). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: para la primera reacción de PCR, se utilizaron 10 ng de DNA en un volumen de reacción de 25- $\mu$ L, conteniendo amortiguador 1X, 200  $\mu$ M de dNTPs (Applied Biosystems), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.0 U de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 100 pmol de cada oligonucleótido, Col (5'-GTA CTA TTA GGG AGG ATA ATC GTT-3') y ColII (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. 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 (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) 0.5X a 100 V por 60 min. Se utilizó el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen, CA, US) 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, se secuenciaron.

### **Secuenciación**

Después de verificar la amplificación correcta de los productos de la PCR, se purificaron usando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La pureza y concentración del producto de amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 0.5X. Para la visualización de las bandas, los geles se teñirán con GelRed (Biotium, 10,000X). El gel se corrió usando el mismo amortiguador a 100 voltios con una fuente de poder Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA). El estándar de tamaño molecular empleado fue de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Las imágenes de los geles se capturaron en un Fotodocumentador GelDoc XR (Bio-Rad Laboratories Inc., CA). La concentración del producto amplificado de DNA se definió por comparación con concentraciones conocidas de 10, 20, 50 y 100 ng de fago  $\lambda$  (Invitrogen). Los amplicones fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, utilizando un secuenciador automatizado ABI Prism 3100 (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, WI, USA). 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 programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), para realizar la identificación a través de una inferencia filogenética.

## **CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *C. immitis* y *C. posadasii***

### **Obtención de exoantígenos**

Se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Kaufman y Standard (1987), como se describe a continuación: a partir de los cultivos crecidos en agar-Mycobiotic (Bioxón®, DF, México), en tubos inclinados los cuales se cultivaron durante 1-2 semanas, se tomó un inóculo y se resembró en un matraz con 350 mL de medio Smith, con ayuda de una asa bacteriológica trabajando en la campana de bioseguridad clase 3, se incubó a temperatura ambiente durante 3 meses. Se agregó un volumen correspondiente al 10% del medio cultivo, de timerosal 1:50 (peso/volumen) para inactivar al hongo. Se separó la masa micelial por filtración con papel filtro y el líquido obtenido se concentró a un volumen final de 2 mL, con el equipo amicon (Amicon, Lexington, Mass) y una membrana de 10,000 NMWL, a una presión de 5 kg/cm<sup>2</sup> ejercida por nitrógeno industrial y con agitación constante. El volumen obtenido después de la concentración, fue recolectado en tubos de 2 mL y enseguida se agregó un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, Germany), de acuerdo con indicaciones de la casa comercial, para evitar la degradación de los exoantígenos, los cuales fueron conservados a -20 ° C hasta su utilización.

### **Doble inmunodifusión en gel de agarosa o análisis de Ouchterlony y Nilsson (1978)**

Se llevó a cabo de acuerdo con Kaufman y Standard (1987), se empleó agarosa al 1% (Standard Low Bio-Rad), con perforaciones según patrones ya establecidos, se colocó el suero positivo en el pozo central y las coccidioidinas en los pozos periféricos. Se utilizaron reactivos de referencia: un suero positivo de un paciente con coccidioidomicosis, una coccidioidina positiva en doble inmunodifusión en gel y solución salina como testigo positivo. Las placas fueron incubadas por un período de 72 horas, al final del cual se revisaron contra un fondo oscuro, para observar las bandas de precipitación, las bandas inespecíficas se eliminaron utilizando citrato de sodio al 5%, posteriormente los geles se tiñeron con negro amido (0.5 g negro amido; 225 mL acetato de sodio; 225 mL ácido acético; 50 mL glicerol), donde se

sumergió la placa en el colorante por unos 15-30 min y posteriormente se decoloró con varios cambios de ácido acético al 5%, dejando finalmente secar la agarosa sobre el vidrio.

### **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (microensayo) (Bradford, 1976)**

La cuantificación de proteínas se realizó como sigue: se utilizó una curva como testigo, utilizando diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) (de 0 a 75  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), como se muestra en la Tabla 2. Las muestras se analizaron por triplicado.

Las muestras de los exoantígenos se diluyeron 1:5 y se tomaron 15  $\mu\text{L}$  de cada muestra, adicionando 145  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 40  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., CA) para un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ , se homogenizó la muestra y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, Inc., USA) a 595 nm para su cuantificación.

**Tabla 2.** Curva de Albúmina Sérica Bovina (BSA).

BSA [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo de Bradford ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Total ( $\mu\text{L}$ )
0	160	40	200
15	145	40	200
30	130	40	200
45	115	40	200
60	100	40	200
75	85	40	200

### **Electroforesis SDS-PAGE**

Las condiciones iniciales para la electroforesis en SDS-PAGE de los exoantígenos obtenidos, se realizó de acuerdo con lo descrito por Filho *et al.* (2012) en condiciones de desnaturalización, como se describe a continuación: Para la preparación del gel separador al 7.5% de poliacrilamida, se utilizó una mezcla de 2,367  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, 1,250  $\mu\text{L}$  de amortiguador separador pH 8.8, 1,250  $\mu\text{L}$  de poliacrilamida al 30%, 50  $\mu\text{L}$  de SDS al 10%, 5  $\mu\text{L}$  de TEMED y 35  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio, la mezcla fue homogenizada e inmediatamente colocada en el molde, cuidando que no se formaran burbujas.

Para eliminar la curvatura (menisco), se depositó muy suavemente en la superficie, una delgada capa (1-2 mm) de isopropanol. Una vez que la interfase entre el polímero y el agua se tornó visible, y después de 10-15 min, se descartó el exceso de líquido de la superficie, y se colocó el peine para muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas). Enseguida, se procedió a la preparación del gel superior (compactador) a una concentración de 7.5 % de poliacrilamida como sigue: se hizo una mezcla de 1,500  $\mu\text{L}$  de agua desionizada, 330  $\mu\text{L}$  de amortiguador separador pH 8.8, 630  $\mu\text{L}$  de poliacrilamida al 30% y 33  $\mu\text{L}$  de SDS. La mezcla fue homogenizada e inmediatamente vertida en el molde evitando la formación de burbujas. Una vez polimerizado el gel, se quitó el peine deslizándolo suavemente, y se lavaron los pozos con agua para eliminar residuos de componentes no polimerizados.

Las muestras de exoantígenos se prepararon en un tubo Eppendorf, a una concentración final de 410 µg, y fueron desnaturalizadas a 95°C por 5 min, y se mezclaron con amortiguador de muestra en una relación 1:5. Las muestras se colocaron en los pozos, previamente lavados con el amortiguador de corrimiento. Se incluyó el marcador de PM de 250 kD (Precision Plus Dual Color, Bio-Rad). Se corrió con amortiguador a 80 voltios (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol alcanzó al gel separador y enseguida se aumentó el voltaje a 100 V (voltaje constante), hasta que el azul de bromofenol llegó al borde inferior del gel (60-120 min). Después de la electroforesis, el gel se tiñó con azul Coomassie R-250 durante 1 hr o durante toda la noche. Se eliminó el exceso de colorante con varios cambios de solución desteñidora (100 mL de metanol+ 75 mL ácido acético+ 325 mL de agua destilada). Para acelerar la decoloración se añadieron trocitos de esponja al recipiente donde se realizó la decoloración, que actúan absorbiendo el colorante. Por último se registraron los resultados por fotografía con el equipo Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad).

### **Western-blot**

Se realizó una electroforesis al 12% en SDS-PAGE en condiciones de desnaturalización, como se describió anteriormente. El gel fue transferido a una membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) previamente activada con metanol absoluto e hidratada con agua destilada y posteriormente incubada durante 5 min con amortiguador de transferencia (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3), a través de un sistema de transferencia semiseco (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, BioRad), durante 30 min a 30 V. Enseguida, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Merk-Millipore), (0.5 g, 1 mL Ácido acético, cbp 100 mL de agua destilada) durante 5 min. La membrana fue bloqueada con albumina al 3% en PBS durante 5 min, utilizando el sistema SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System, este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (suero de paciente con coccidioidomicosis probada), durante 5 min, utilizando diferentes diluciones de éste (1:250, 1:300 y 1:500), este procedimiento se repitió tres veces. Se procedió a lavar la membrana con PBS/Tween 0.05% por 5 veces. La membrana fue incubada con el anticuerpo

secundario Anti-IgG-conjugado a HRP (Horseradish peroxidase) diluído con 10 mL de albumina 1% /PBS/Tween 0.05% + 1  $\mu$ L de Streptactin HRP (BioRad) y se probaron diferentes concentraciones del anticuerpo (1:10,000, 1:15,000 y 1:20,000), durante 5 min. Enseguida se procedió a lavar la membrana con PBS/Tween 0.05% y revelarla con el sustrato Luminata TM Crescendo (Merk-Milipore), y fue visualizada a través del sistema ChemiDoc™ MP System (BioRad) y del programa Image Lab™ Software.

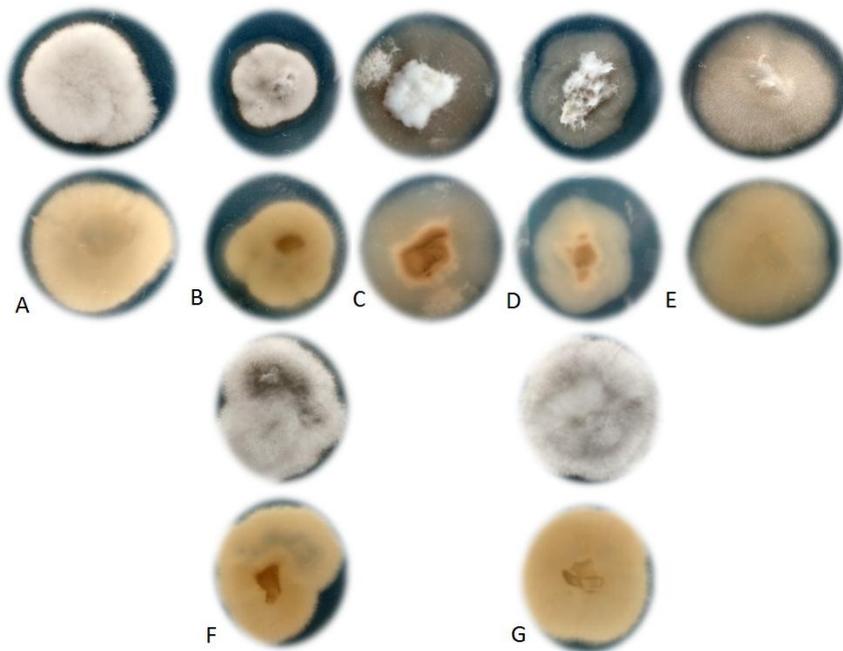
### **Análisis de datos**

Se calculó el promedio y la desviación estándar del tamaño de los artroconidios de los aislados incluidos en el estudio, con el programa Office-Excel 2007. Por otro lado, los geles de poliacrilamida fueron analizados en un fotodocumentador Gel-Doc (BioRad) para documentar los patrones electroforéticos en cada gel, analizar los patrones de bandas obtenidas para cada exoantígeno y determinar el peso molecular de cada banda, de acuerdo al marcador de peso molecular.

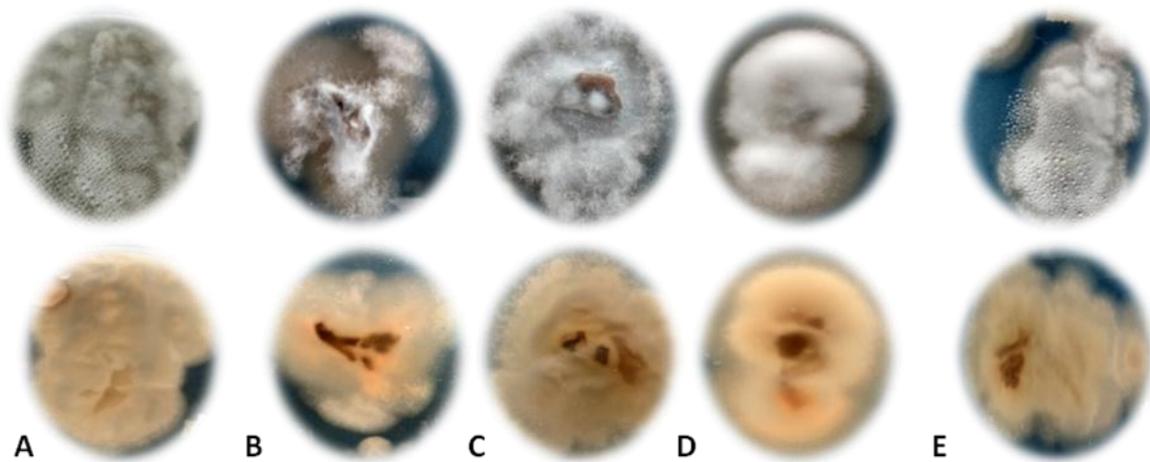
## **RESULTADOS**

### **Macro y micromorfología**

Todos los aislados presentaron la macromorfología típica de la especie. En general, la textura de las colonias fueron 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. De manera similar, el reverso en la mayoría de los aislados, también fue de color marrón claro a oscuro (Figura 1 y 2).



**Figura 1.** Macromorfología de aislados de *Coccidioides* spp. Las colonias muestran texturas vellosas, con bordes lisos y algunas de aspecto pulverulento. Aislados; A) GGM; B) HU-1; C) QR; D) O83376; E) ZVJ; F) QR; G) QR.



**Figura 2.** Macromorfología de aislados de *Coccidioides* spp. Las colonias muestran texturas vellosas, con bordes lisos y algunas de aspecto pulverulento. Aislados; A) 30.1; B) 43.3; C) 62; D) PRA; E) M40-05.

### Tamaño de arthroconidios

El tamaño de los arthroconidios para todos los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* fueron desde 2.56 a 3.41  $\mu\text{m}$  para el ancho y de 4.61 a 6.66  $\mu\text{m}$  para el largo (Tabla 3).

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

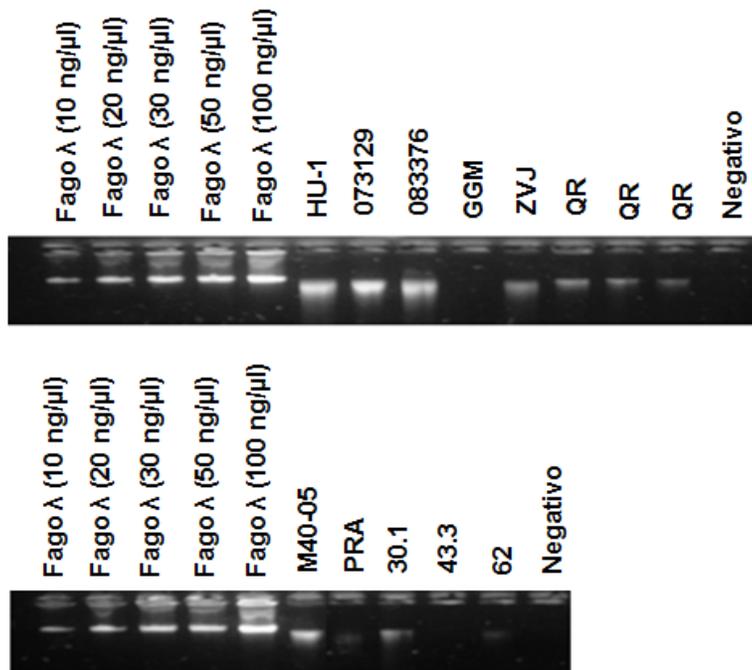
Aislado	Largo ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ DE*	Ancho ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ DE*
HU-1	5.89 $\pm$ 1.19	2.56 $\pm$ 0.0
073129	4.61 $\pm$ 0.64	2.56 $\pm$ 0.0
083376	5.59 $\pm$ 1.09	3.41 $\pm$ 0.61
GGM	5.98 $\pm$ 1.23	2.60 $\pm$ 0.23
ZVJ	5.21 $\pm$ 0.47	2.56 $\pm$ 0.0
QR	5.92 $\pm$ 1.72	2.77 $\pm$ 0.75
M40-05	6.66 $\pm$ 1.27	2.56 $\pm$ 0.0
PRA	5.89 $\pm$ 1.20	2.56 $\pm$ 0.0
30.1	5.46 $\pm$ 1.58	3.37 $\pm$ 0.63
43.3	5.51 $\pm$ 0.96	3.07 $\pm$ 0.63
62	5.21 $\pm$ 0.47	2.56 $\pm$ 0.02

\*DE: Desviación Estándar

### CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

#### Extracción de DNA genómico

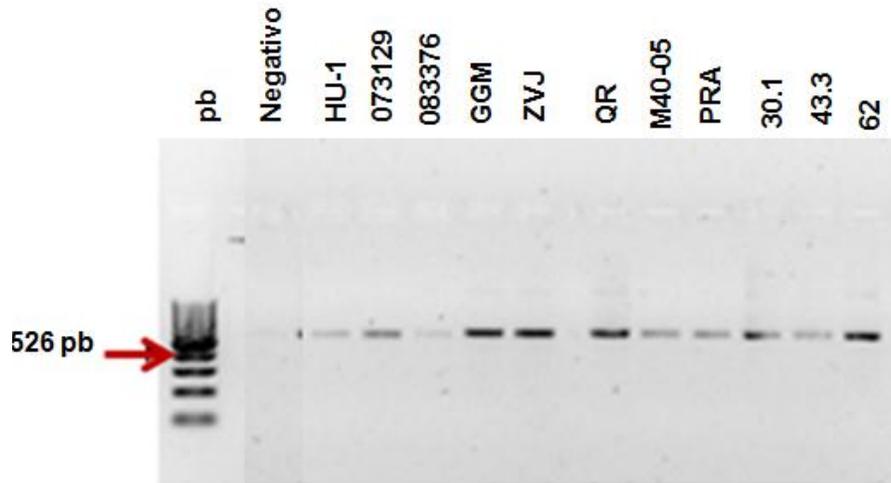
Se obtuvo el DNA genómico de los 11 aislados de *Coccidioides* spp. incluidos en el estudio (Tabla 1). La pureza, integridad y cantidad de DNA fue adecuada para la PCR. En la figura 3 se observa el análisis electroforético de los DNAs obtenidos de los aislados de *Coccidioides* spp., en el que se aprecian concentraciones variables que fueron desde 100 hasta 500 ng/2 $\mu\text{L}$ ).



**Figura 3.** DNAs obtenidos de aislados de *Coccidioides* spp. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1% y el gel fue teñido con GelRed. Se utilizaron diferentes concentraciones de fago  $\lambda$  como DNA de referencia.

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

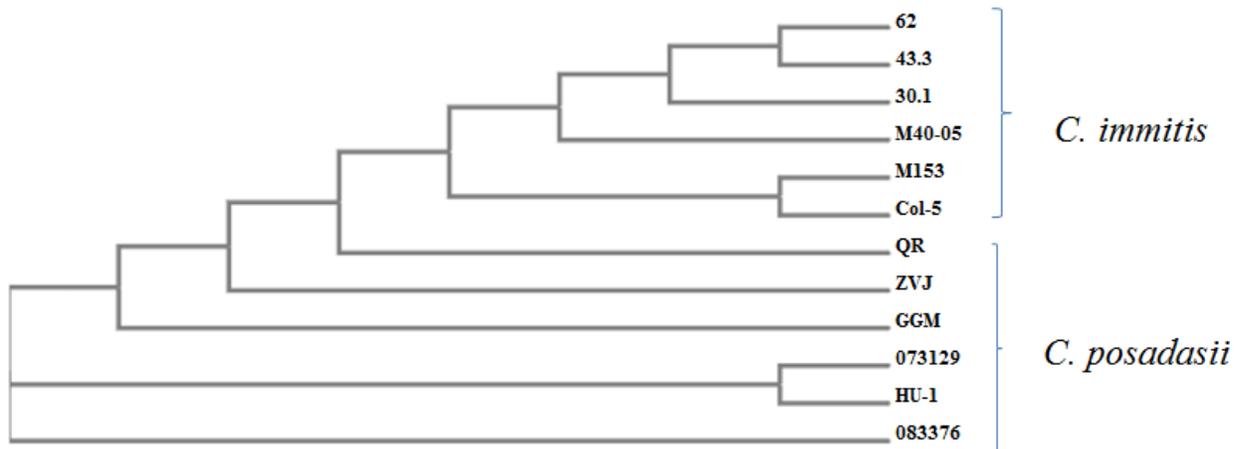
El método empleado para identificar los aislados incluidos en el presente estudio, fue el descrito por Bialek *et al.* (2004), el cual mostró que todos los aislados probados dieron la banda esperada, correspondiente a un amplicón de 526 pb (Figura 4).



**Figura 4.** PCR de DNAs de *Coccidioides* spp. de acuerdo al método descrito por Bialek *et al.* (2004). En todos los aislados se obtuvo un amplicón de 526. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.5% y fue teñido con GelRed, como se describe en materiales y métodos.

Por otro lado, el análisis de las secuencias de los amplicones de 526 pb, obtenidos en la PCR, de acuerdo a Bialek *et al.* (2004), mostró que seis de los aislados estudiados, correspondieron a la especie *C. posadasii* (HU-1, 073129, 083376, GGM, ZVJ, QR) y cinco a *C. immitis* (M40-05, PRA, 30.1, 43.3, 62), 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).

Por último, estos aislados también fueron identificados como *C. immitis* y *C. posadasii* a través del análisis de inferencia filogenética por Neighbour Joining (Figura 5), donde se observa que los aislados M40-05, PRA, 30.1, 43.3, 62 se agrupan con las cepas de referencia pertenecientes a *C. immitis*, mientras que los aislados HU-1, 073129, 083376, GGM, ZVJ, QR se agrupan con las cepas de referencia pertenecientes a *C. posadasii*.



**Figura 5.** Árbol construido por el método de Neighbour Joining. Se formaron dos grupos, uno que corresponde a los aislados de *C. immitis* y otro a los aislados de *C. posadasii*. M153: aislado de referencia de *C. immitis*.

### **Preservación de los cultivos monospóricos de *Coccidioides* spp.**

Todos los aislados (cultivos monospóricos) incluidos en el estudio fueron preservados en agar-Mycobiotic, con y sin aceite mineral, a 4 °C e incorporados a la Colección del Laboratorio de Micología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

### **Caracterización de exoantígenos**

La identidad antigénica de todos los exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii* incluidos en este estudio fue corroborada por el método de doble inmunodifusión en gel (IDG). En todos los aislados se confirmaron las características antigénicas de la especie por la presencia de dos bandas de precipitación (Figura 6). Los 11 exoantígenos probados dieron doble banda de identidad.



**Figura 6.** 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 Métodos. Ag (+): Antígeno de referencia; Ac (+): Suero positivo anti-*Coccidioides*; SS (-): Solución Salina.

### Cuantificación de proteínas

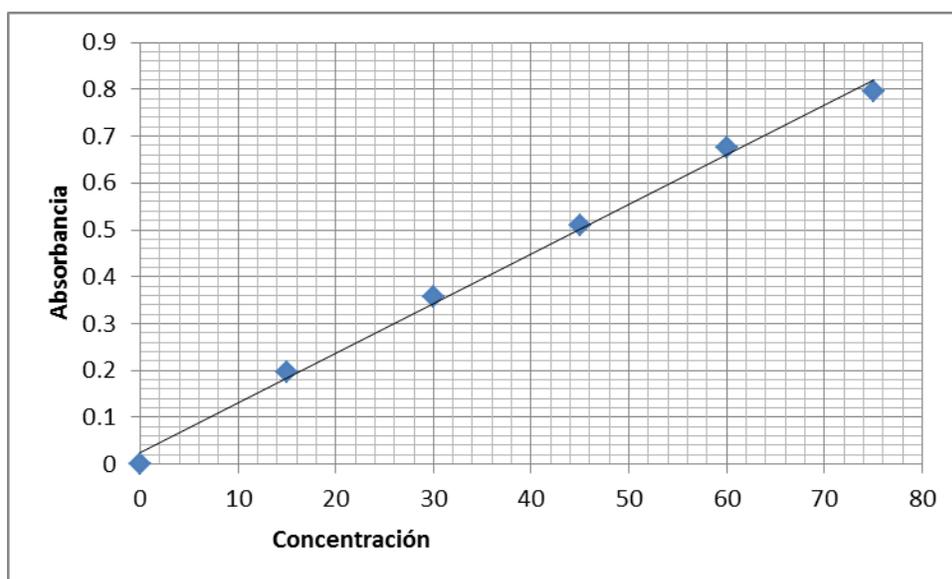
Los resultados de la cuantificación de cada uno de los exoantígenos se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Cuantificación de proteínas de los exoantígenos obtenidos de *C. immitis* y *C. posadasii*

Exoantígenos (aislado clínico)	Concentracion ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Especie
HU-1	14.335	<i>C. posadasii</i>
073129	16.281	<i>C. posadasii</i>
083376	16.421	<i>C. posadasii</i>
GGM	21.851	<i>C. posadasii</i>
ZVJ	21.241	<i>C. posadasii</i>
QR	20.858	<i>C. posadasii</i>
M40-05	11.281	<i>C. immitis</i>
PRA <sub>1</sub>	14.741	<i>C. immitis</i>

PRA <sub>2</sub>	16.701	<i>C. immitis</i>
30.1	18.062	<i>C. immitis</i>
43.3	25.686	<i>C. immitis</i>
62	16.408	<i>C. immitis</i>

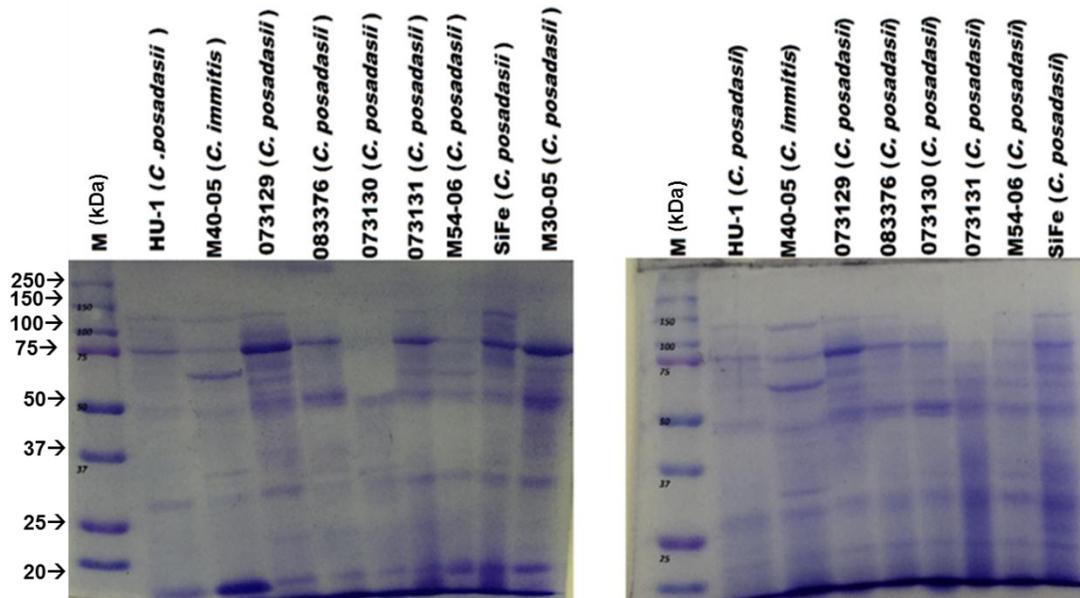
La curva de BSA, utilizada como estándar para la cuantificación de los exoantígenos, con un rango de 0 a 75  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabla 4), leída en espectrofotómetro a 570- 595 nm, se muestra en la figura 7.



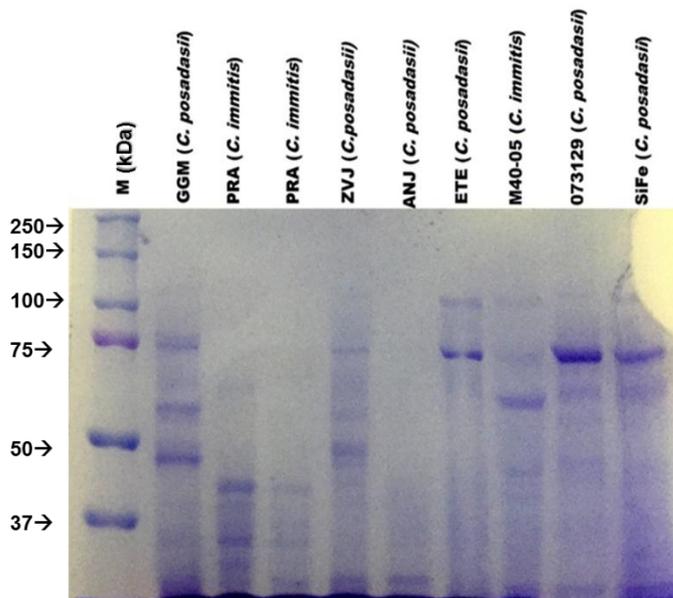
**Figura 7.** Curva estándar de BSA.

### **Electroforesis SDS-PAGE**

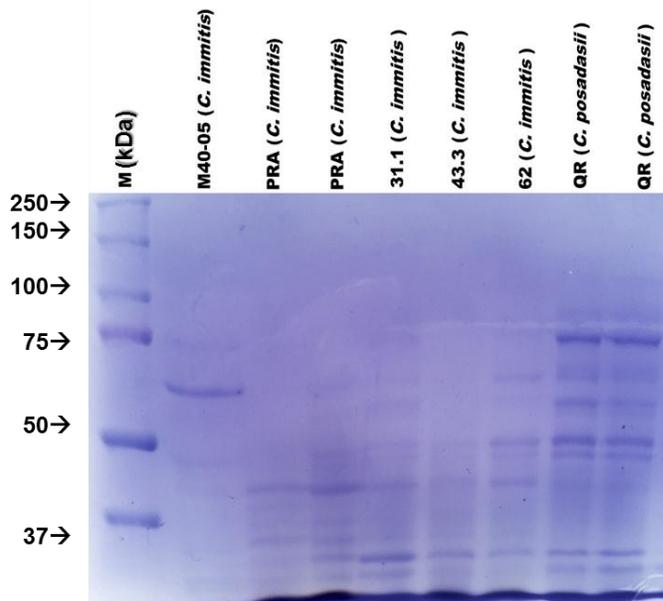
A través de la electroforesis en SDS-PAGE, con concentración de poliacrilamida al 7.5%, se observaron bandas con pesos moleculares de entre 15-150 kDa, tanto en los exoantígenos de *C. immitis* como de *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de proteínas de 410  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para todas las muestras. (Figuras 8-10).



**Figura 8.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 7.5% de poliacrilamida, como se describió en métodos. M: Marcador de tamaño molecular de 250 kDa.

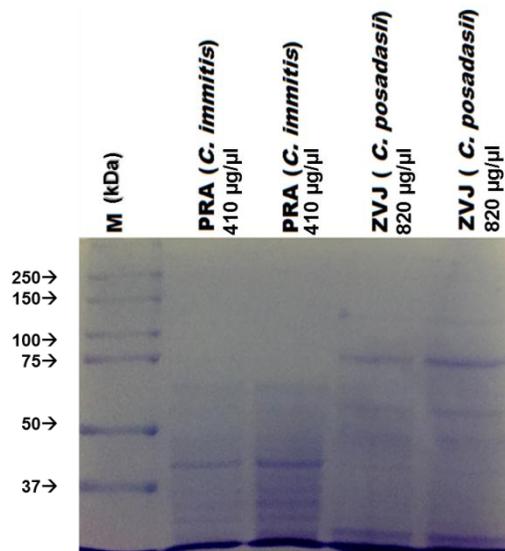


**Figura 9.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 7.5% de poliacrilamida, como se describió en métodos. M: Marcador de tamaño molecular de 250 kDa



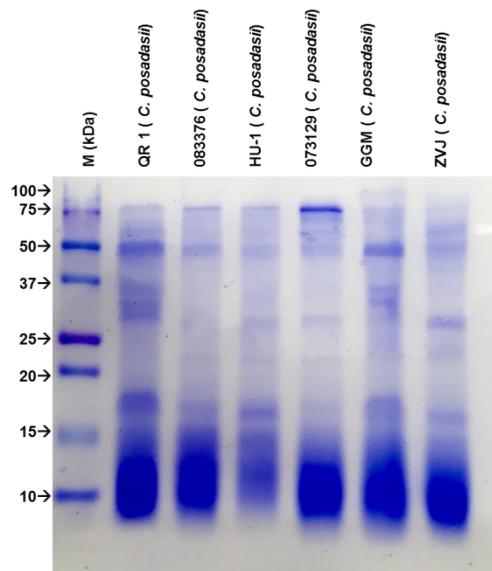
**Figura 10.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 7.5% de poliacrilamida, como se describió en métodos. M: Marcador de tamaño molecular de 250 kDa

Además, se realizaron ensayos de electroforesis en SDS-PAGE con concentración de poliacrilamida al 7.5%, con diferentes concentraciones de proteínas (410, 615 y 820  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Figura 11).

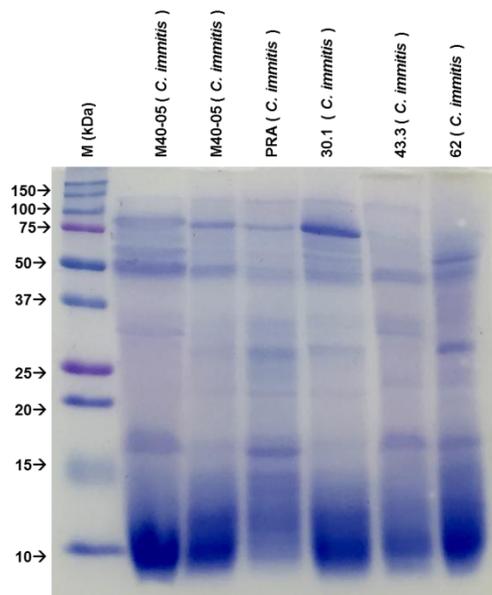


**Figura 11.** Electroforesis en SDS-PAGE con diferentes concentraciones de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 7.5% de poliacrilamida. M: Marcador de tamaño molecular 250 kDa

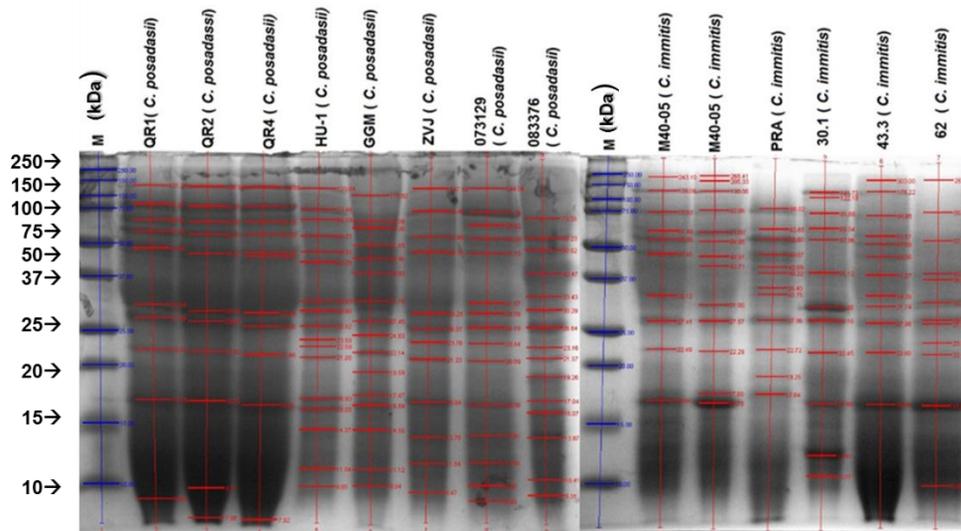
Debido a que la resolución de los geles no eran adecuadas, se realizaron ensayos de SDS-PAGE con una concentración de poliacrilamida de 12 % (Figura 12-14).



**Figura 12.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 12 % de poliacrilamida. M: Marcador de tamaño molecular 250 kDa.



**Figura 13.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 12% de poliacrilamida. M: Marcador de tamaño molecular 250 kDa



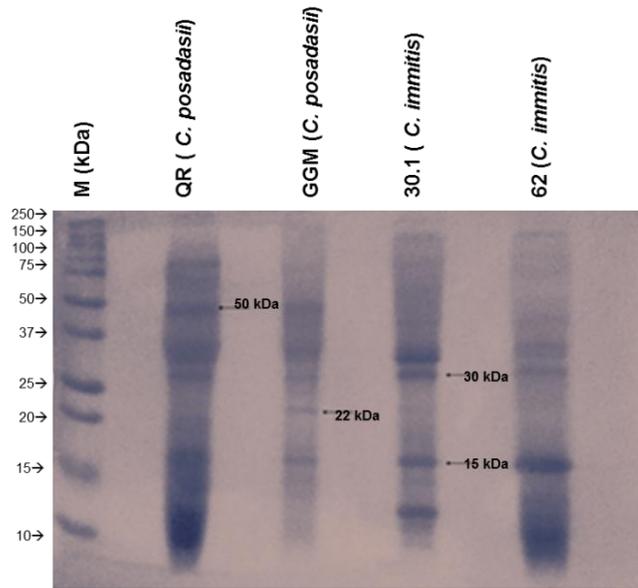
**Fig 14.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. El peso molecular de cada una de las bandas de los patrones proteicos fue analizado con ayuda del programa Quantity One® 1-D Analysis Software (BioRad). Se utilizó una concentración de 12% de poliacrilamida. M: Marcador de tamaño molecular 250 kDa.

Se construyó una tabla de datos binarios de presencia/ausencia de bandas a partir del análisis con el fotodocumentador de los patrones electroforéticos obtenidos con los exoantígenos analizados, para identificar con mayor precisión la existencia de bandas especie-específicas (Tabla 5). Se encontraron 10 bandas para el exoantígeno QR1; 10 bandas para el QR2; 9 bandas para el QR4; 16 bandas para el HU-1; 15 bandas para el GGM; 10 bandas para el ZVJ; 13 bandas para el 073129; 14 bandas para el 083376; 9 bandas para el M40-05; 12 bandas para el PARA; 10 bandas para el 30.1; 11 bandas para el 43.3 y 9 bandas para el exoantígeno 62 (Figura 14).

**Tabla 5.** Matriz de datos binarios de presencia/ausencia de bandas en los patrones electroforéticos de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*.

PM (KDa)	QR1	QR2	QR4	HU-1	GGM	ZVJ	O73329	83376	M40-05	PRA	30.1	43.3	62
131	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
65	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
35	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
21	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
18	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1

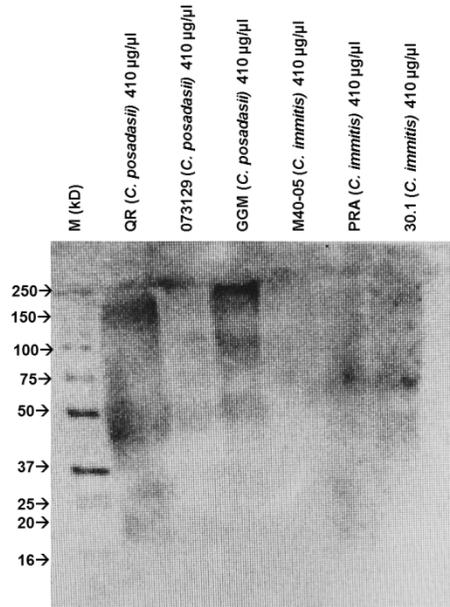
A pesar de utilizar diferentes concentraciones de poliacrilamida para la SDS-PAGE, no fue posible identificar bandas especie-específicas, sin embargo se identificaron varias bandas, presentes tanto en aislados de *C. immitis* como en los aislados de *C. posadasii* (50, 30, 22 y 15 kDa), las cuales fueron elegidas para enviar a secuenciar (Figura 15).



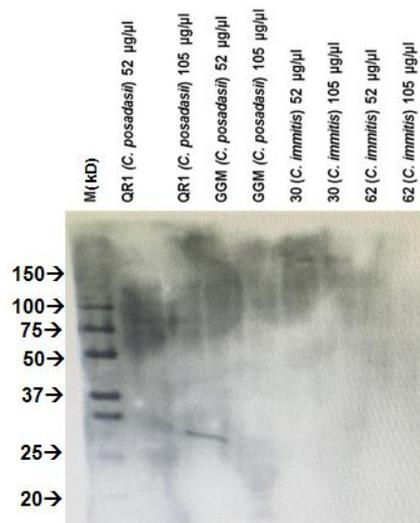
**Figura 15.** Electroforesis en SDS-PAGE de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de 12% de poliacrilamida. M: Marcador de tamaño molecular 250 kD.

### Western blot

Los ensayos de Western blot mostraron que una banda común de aproximadamente 50 kDa, presente tanto en los antígenos de *C. immitis* como de *C. posadasii*, fue reconocida por suero de paciente con coccidioidomicosis probada (Figura 16), sin embargo los resultados no fueron completamente satisfactorios, ya que a pesar de probar diferentes concentraciones de antígenos, anticuerpo primario, anticuerpo secundario y solución bloqueadora, no hubo una adecuada evidencia del reconocimiento antígeno-anticuerpo (Figuras 16 y 17).



**Figura 16.** Western blot de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de anticuerpo primario (suero de paciente con coccidioidomicosis probada) 1:250 y un anticuerpo secundario anti-humano con una concentración 1:15,000. M: Marcador de tamaño molecular 250 kDa.



**Figura 17.** Western blot de exoantígenos de *C. immitis* y *C. posadasii*. Se utilizó una concentración de anticuerpo primario (suero de paciente con coccidioidomicosis probada) 1:250 y un anticuerpo secundario anti-humano con una concentración 1:15,000. M: Marcador de tamaño molecular 250 kDa.

## Discusión

En México, la mayoría de los laboratorios que realizan el diagnóstico para la coccidioidomicosis, lo hacen a través de pruebas serológicas y utilizan la coccidioidina como antígeno, a pesar que estos antígenos presentan cruce inmune, ya que comparte fracciones antigénicas con otros hongos, sin embargo, el diagnóstico con base en la serología ha sido considerado una alternativa útil en esta enfermedad. Además, varios estudios, han evidenciado la importancia de las pruebas serológicas para el diagnóstico y el seguimiento de pacientes con coccidioidomicosis (Ampel, 2010; Pappagianis, 2001; de Cordeiro *et al.*, 2009; Blair *et al.*, 2006), entre éstas se encuentran la prueba de inmunodifusión en gel, precipitación en tubo y fijación de complemento, que puede detectar anticuerpos IgM o IgG, por lo tanto proporcionan información sobre el estado de la enfermedad (Blair y Currier, 2008). No obstante, estas pruebas pueden presentar una gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad, por lo que la búsqueda de antígenos para el diagnóstico de la coccidioidomicosis sigue vigente.

A pesar de que se han reportado en la literatura varios antígenos de *Coccidioides* (Pappagianis, 2001, Kaufman y Standard 1978, Cox y Britt 1986, Galgiani *et al.* 1992, Johnson y Pappagianis, 1992), todos tienen ciertos inconvenientes y no se encuentran accesibles para todos los laboratorios. Sin embargo, la eficiencia de los antígenos crudos, obtenidos de aislados locales, ha sido probada y ha mostrado su utilidad en estudios epidemiológicos, debido a su bajo costo, fácil manejo y rápida detección (Toriello *et al.*, 1997). Por otro lado, es importante considerar que la obtención de antígenos a partir de aislados autóctonos es de gran importancia, debido a que se ha demostrado que *Coccidioides* spp. presenta gran variabilidad genética (Duarte-Escalante *et al.* 2013), y existe la posibilidad de que los antígenos obtenidos a partir de aislados de otros países no funcionen en la detección del hongo en nuestro país. De manera que, la obtención y caracterización de antígenos locales en el presente estudio, es una aportación que puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de la coccidioidomicosis.

A pesar de que la utilización de antígenos crudos puede revelar resultados contradictorios, como ha sido demostrado por Brilhante *et al.*(2008), quienes

probaron antígenos comerciales contra antígenos locales y sugieren que es de gran importancia la producción de antígenos de cepas locales con el fin de mejorar el diagnóstico de la coccidioidomicosis, principalmente en infecciones extrapulmonares.

Por otro lado, para llevar a cabo la caracterización de los antígenos de *Coccidioides* spp., primero se procedió a identificar a los aislados a nivel de especie, lo cual se realizó por inferencia filogenética, analizando la secuencia del amplicón de 526 pb obtenido en la PCR (Bialek *et al.*, 2004). (Figura 4), esto nos permitió identificar cinco aislados correspondientes a *C. immitis* y seis a *C. posadasii*. Enseguida se procedió a la identificación por macro y micromorfología (Figuras 1 y 2), en la cual se mostró que todos los aislados presentaron las características descritas para estas especies (Fisher *et al.*, 2002).

Asimismo, a través de la prueba de inmunodifusión se confirmaron las características antigénicas de *Coccidioides*, por la presencia de dos bandas de precipitación (Figura 5), ya que fueron capaces de reconocer muestras de suero de pacientes con coccidioidomicosis probada (Figura 5), lo que fortalece la utilidad de los antígenos crudos en el serodiagnóstico de la coccidioidomicosis, lo cual ha sido descrito por Toriello *et al.* (1991). Además, otros grupos de investigación también sugieren la importancia de los antígenos crudos en el diagnóstico de la coccidioidomicosis, así como en estudios epidemiológicos (Brilhante *et al.*, 2008; de Aguiar-Cordeiro *et al.*, 2013; Moreira Filho *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque en México se utiliza este antígeno en el diagnóstico de la coccidioidomicosis, es importante mencionar que existen zonas endémicas para micosis profundas como la histoplasmosis y paracoccidioidomicosis, así como para otras micosis como la esporotricosis, donde la coccidioidina puede reconocer antígenos presentes en los hongos que producen estas micosis, incluso en la tuberculosis. Por lo que es importante obtener antígenos especie-específicos y una buena opción es identificarlos a partir de SDS-PAGE.

Sin embargo, los antígenos analizados por SDS-PAGE unidimensional en condiciones de desnaturalización mostró la presencia de bandas en el intervalo de 15-150 kDa (Figuras 11-13) en ambas especies, sin embargo no fue posible

identificar bandas específicas de especie, a pesar de probar con diferentes concentraciones de poliacrilamida para intentar una mejor definición de los patrones electroforéticos. No obstante, una banda común de 50 kDa, presente tanto en aislados de *C. immitis* como de *C. posadasii*, fue reconocida por suero de pacientes con coccidioidomicosis en ensayos de Western-blot (Figuras 16 y 17). La secuencia de esta banda, analizada a través de BLAST, mostró una identidad de 100% con las secuencias de proteínas de *C. immitis* y *C. posadasii* de aislados de referencia del GenBank, lo que sugiere que esta secuencia puede ser utilizada para el diseño de un marcador molecular que permita la identificación rápida en el diagnóstico de la coccidioidomicosis en México. Sin embargo, será necesario realizar ensayos que permitan estandarizar el procedimiento y probar el marcador con un número significativo de muestras biológicas de pacientes con sospecha de coccidioidomicosis.

Por otro lado, de Aguiar-Cordeiro *et al.* (2013) proponen que para optimizar el diagnóstico de la coccidioidomicosis es necesario considerar el examen micológico de laboratorio, las pruebas de inmunodifusión cualitativas o semicuantitativas con base en antígenos estándar y antígenos experimentales y los métodos que se realizan con base en la PCR de muestras clínicas. Es decir, hasta la fecha no existe un método que por sí solo permita diagnosticar esta enfermedad, más bien se trata del empleo de varios métodos.

## **Conclusión**

La obtención de una banda común de 50 kDa a partir de los antígenos crudos de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* y reconocida por suero de paciente con coccidioidomicosis probada, puede ser útil en el diseño de un marcador molecular para el diagnóstico de la coccidioidomicosis.

## Referencias

- Baptista Rosas RC, Riquelme M. 2007. Epidemiología de la coccidioidomicosis en México. *Rev Iberoam Micol* 24:100-105.
- Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Ceceñas L, Reischl U, González GM. 2004. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol* 42:778-783.
- Blair JE, Coakley B, Santelli AC, Hentz JG and Wengenack NL. 2006. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. *Mycopathologia* 162:317–324.
- Blair JE, Currier JT. 2008. Significance of isolated positive IgM serologic results by enzyme immunoassay for coccidioidomycosis. *Mycopathologia* 166:77-82.
- Borelli D, Pérez M, Molina T. 1991. Coccidioidomicosis: un caso más en el bosque muy seco tropical. *Dermatol Venez* 29:119-123.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brilhante, RSN, Cordeiro RA, Rocha MFG, Fachine MAB, Furtado FM, Nagao-Dias MAT, Camargo ZP, Sidrim JJC. 2008. Coccidioidal pericarditis: A rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. *J Med Microbiol* 57: 1288–1292.
- Brown J, Benedict K, Park BJ, Thompson GR 3rd. 2013. Coccidioidomycosis: epidemiology. *Clin Epidemiol* 5:185–97.
- 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. 2010. Coccidioidomycosis in Argentina, 1892-2009. *Rev Argent Microbiol* 42:261-268.
- Canteros CE, Toranzo A, Suárez-Alvarez R, Davel G, Castañón-Olivares LR, Nápoli J. 2009. Identidad genética del hongo causante del primer caso de

- coccidioidomycosis descrito por Alejandro Posadas en 1892. *Medicina (Buenos Aires)* 69:215-220.
- Carrada-Bravo T. 2014. Los métodos de laboratorio en el diagnóstico de la coccidioidomycosis. *Rev Chilena Infectol* 31(3): 293-297.
- Casal JI, Alvarez RO, Lee W, Rivas MC, Davel G, Canteros CE. 2008. Coccidioidomycosis diseminada en un canino. *Rev Argent Microbiol* 40:109-109.
- CDC. 2013. Increase in reported coccidioidomycosis—United States, 1998–2011. *Morb Mortal Wkly Re* 62(12):217–221.
- Cox RA, Britt LA. 1986. Isolation of a coccidioidin component that reacts with immunoglobulin M precipitin antibody. *Infect Immun* 53(3): 3449-453.
- Cox RA, Dolan MJ, Magee DM, Galgiani JN. 1993. Production of a murine monoclonal antibody that recognizes an epitope specific to *Coccidioides immitis* antigen 2. *Infect Immun* 61:1895–1899.
- de Aguiar Cordeiro R, Bezerra Fechine MA, Nogueira Brilhante RS, Gadelha Rocha MF, Freire da Costa AK, Tiemi Dias Nagao MA, Pires de Camargo Z, Costa Sidrim JJ. 2009. Serologic detection of coccidioidomycosis antibodies in northeast Brazil. *Mycopathologia* 167:187–190.
- de Aguiar Cordeiro R, Patoilo KR, Praciano SB, Medrano DJ, de Farias Marques FJ, Martins LM, Eulalio KD, de Deus Filho A, Cavalvanti Mdo A, Fechine MA, Brilhante RS, de Camargo ZP, Rocha MF, Sidrim JJ. 2013. Antigens of *Coccidioides posadasii* as an important tool for the immunodiagnosis of coccidioidomycosis. *Mycopathologia* 175:25-32.
- Domínguez-Cota G, Zamora-Angulo LE, Osuna-Beltrán E, Vega-Rosas CE. 2001. Coccidioidomycosis cutánea primaria. Estudio epidemiológico y clínico. Serie de 16 casos. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana CIMEL* 006:49-53.
- 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* 3:13:411.

- Dugger KO, Galgiani JN, Ampel NM, Sun SH, Magee DM, Harrison J, Law JH. 1991. An immunoreactive apoglycoprotein purified from *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 59:2245–2251.
- Dugger KO, Villareal KM, Ngyuen A, Zimmermann CR, Law JH, Galgiani JN. 1996. Cloning and sequence analysis of the cDNA for a protein from *Coccidioides immitis* with immunogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 218:485–489.
- Durkin M, Connolly P, Kuberski T, Myers R, Kubak BM, Bruckner D, Pegues D, Wheat LJ. 2008. Diagnosis of Coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* Antigen Enzyme Immunoassay. *Clin Infect Dis* 47:69–73.
- Filho RE, Bandeira SP, Brillhante RS, Rocha MF, Vasconcelos IM, Pereira ML, Castelo-Branco Dde S, Rocha FA, Camargo ZP, Ramos MV, Cordeiro R de A, Sidrim JJ. 2012. Biochemical characterization of an in-house *Coccidioides* antigen: perspectives for the immunodiagnosis of coccidioidomycosis. *Molecules* 17:7854-7863.
- Fisher MG, Koenig GI, White TJ, Taylor JW. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. Nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94:73-84.
- Fraser JA, Heitman J. 2003. Fungal mating-type loci. *Curr Biol* 13: R792-R795
- Fraser JA,<sup>1</sup> 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.
- Frey CL, Drutz DJ. 1986. Influence of fungal surface components on the interaction of *Coccidioides immitis* with polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 153(5):993-943.
- Galgiani JN, Dugger KO, Ito JI and Wieden MA. 1984. Antigenemia in primary coccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 33:645–649.
- Galgiani IN, Sun SH, Dugger KO, Ampel NM, Grace GG, Harrison J, Wieden. 1992. An arthroconidial-spherule antigen of *Coccidioides immitis*: differential expression during in vitro fungal development and evidence for humoral

- response in humans after infection or vaccination. *Infect Immun* 60:2627-2635.
- García Pérez HM. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag* 1(2):31-41.
- Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor JW. 2000. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 92: 406-410.
- Hector RF, Laniado-Laborin R. 2005. Coccidioidomycosis—a fungal disease of the Americas. *PLoS Med* 2(1):e2.
- 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.
- Herr RA, Hung C, Cole GT. 2007. Evaluation of two homologous Proline-Rich Proteins of *Coccidioides posadasii* as candidate vaccines against coccidioidomycosis. *Infect Immun* 75(12):5777–5787.
- Herrera LE, Gómez V, Morales-Blanhir JE. 2006. Coccidioidomycosis: Serie de casos. *Neumol Cir Torax* 65:206-213.
- 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. *Jornal Brasileiro de Pneumologia J Bras Pneumol* 35:275-279.
- Hung CY, Yu JJ, Lehmann PF, Cole GT. 2001. Cloning and expression of the gene which encodes a tube precipitin antigen and wall associated beta-glucosidase of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 69:2211–2222.
- Johnson L, Gaabb EM, Sanchez J, Bui PQ, Nobile CJ, Hoyer KK, Peterson MW, David M, Ojcius DM. 2014. Valley fever: Danger lurking in a dust cloud. *Microbes Infect* 16(8): 591–600.
- Johnson SM, Pappagianis D. 1992. The coccidioidal complement fixation and immunodiffusion-complement fixation antigen is a chitinase. *Infect Immun* 60:2588–2592.

- Johnson SM, Zimmermann R and Pappagianis D. 1996. Use of a recombinant *Coccidioides immitis* complement fixation antigen-chitinase in conventional serological assays. J Clin Microbiol 34:3160–3164.
- Kaufman L, Sekhon AS, Moledina N, Jalbert M and Pappagianis D. 1995. Comparative evaluation of commercial Premier EIA and microimmunodiffusion and complement fixation tests for *Coccidioides immitis* antibodies. J Clin Microbiol 33:618–619.
- Kaufman L, Standard P. 1978. Immuno-identification of cultures of fungi pathogenic to man. J Clin Microbiol 1:135–140.
- Kaufman L., Standard P. 1987. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. Annu Rev Microbiol 41:209–225.
- Kuberski T, Myers R, Wheat LJ, Durkin M, Connolly P, Kubak BM, Bruckner D, Pegues D. 2007. Diagnosis of coccidioidomycosis by antigen detection using cross-reaction with a *Histoplasma* antigen. Clin Infect Dis 44:e50–4.
- Laniado-Laborin R. 2007. Expanding understanding of epidemiology of Coccidioidomycosis in the western hemisphere. Ann NY Acad Sci 1111:19-34.
- Laniado-Laborín R. 2007a. Coccidioidomycosis and other endemic mycoses in México. Revista Iberoamericana de Micología Rev Iberoam Micol 24:249-258.
- Laniado-Laborin R, Cárdenas-Moreno RP, Álvarez-Cerro M. 1991. Tijuana: zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. Salud Pública Méx 33:235-239.
- Levine HB, Cobb JM, Smith CE. 1961. Immunogenicity of spherule-endospore vaccine of *Coccidioides immitis* for mice. J Immunol 87: 218-227.
- Levine HB, González-Ochoa A, Ten Eyck DR. 1973. Thermal sensitivity to *Coccidioides immitis* a comparison of response elicited in man by spherulin and coccidioidin. Am Rev Respir Dis 107: 379-386.
- 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.
- Martins TB, Jaskowski TD, Mouritsen CL and Hill HR. 1995. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* 33:940–943.
- 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 Méx Mic* 25:15-19.
- 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.
- Moroyoqui-Navarro LA, Figueroa-Sauceda SR. 2008. Coccidioidomycosis. *Med Int Méx* 24:125-141.
- 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.
- 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* 27:813-820.
- Nguyen C, Barker BM, Hoover S, Nix DE, Ampel NM, Frelinger JA, Orbach MJ, Galgiani JN. 2013. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 26(3):505–525.
- Orsborn K, Galgiani JN. 1998. Detecting serum antibodies to a purified recombinant proline-rich antigen of *Coccidioides immitis* in patients with coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 27:1475–1478.

- Ouchterlony O, Nilsson LA. 1978. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. *In*: Weir, D.M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 19.1-19.44.
- Pan S, Cole GT. 1995. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. *Infect Immun* 63:3994–4002.
- Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ and 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.
- Reviákina V; Panizo M; Dolande M, Maldonado B. 2002. Micosis profundas sistémicas: Casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante 5 años (1997-2001). *Rev Soc Ven Microbiol* 22:164-168.
- Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D. 2007. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Ann N Y Acad Sci* 1111:301-314.
- Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D. 2007a. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 45(1):26-30.
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28(5):815-820.
- Smith CE, Saito MT and Simons SA. Pattern of 39,500 serologic tests in coccidioidomycosis. 1956. *J. Am Med Assoc* 160:546–552.
- Stockamp NW, Thompson GR III. 2016. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin N Am* 30: 229–246.
- Thompson GR 3rd, Bays DJ, Johnson SM, Cohen SH, Pappagianis D, Finkelman MA. 2012. Serum (1->3)- $\beta$ -D-glucan measurement in coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 50(9):3060-3062.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680.

- 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.
- Torres-Nájera M, de la Garza-Galván S, Cerda-Flores RM, Necedal-Rustrián FC, Calderón-Garcidueñas AL. 2006. Coccidioidomycosis osteoarticular: estudio clinicopatológico de una serie de 36 pacientes mexicanos. *Rev Invest Clin* 58:211-216.
- 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.
- Wack EE, Dugger KO and Galgiani JN. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for antigens of *Coccidioides immitis*: human sera interference corrected by acidification-heat extraction. *J Lab Clin Med* 111:560–565.
- Weiner MH. 1983. Antigenemia detected in human coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 18:136–142.
- Yang MC, Magee M, Kaufman L, Zhu Y and Cox RA. 1997. Recombinant *Coccidioides immitis* complement-fixing antigen: detection of an epitope shared by *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces dermatitidis*. *Clin Diag Lab Immunol* 4:19–22.
- Zhu Y, Yang C, Magee DM, Cox RA. 1996. *Coccidioides immitis* antigen 2: analysis of gene and protein. *Gene* 181:121–125.
- Zhu Y, Yang C, Magee DM, Cox RA. 1996a. Molecular cloning and characterization of *Coccidioides immitis* antigen 2 cDNA. *Infect Immun* 64:2695–2699.
- Zimmermann CR, Johnson SM, Martens GW, White AG, Pappagianis D. 1996. Cloning and characterization of the complement fixation antigen-chitinase of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 64:4976–4975.