



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la especificidad y sensibilidad del marcador molecular

SCAR₃₀₀ para identificar *Coccidioides* spp. en muestras biológicas

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Victoriano Pastelin Isai

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Esperanza Duarte Escalante

ASESOR INTERNO:

Q.F.B. Patricia Vidal Millán



CIUDAD DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

Al Laboratorio de Micología Molecular, Unidad de Micología, Facultad de Medicina, UNAM

A la doctora, Reyes Montes María Del Rocío y a la Doctora Esperanza Duarte Escalante por su apoyo y comprensión al aceptarme en el laboratorio, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por su apoyo y gran paciencia en todo momento en la realización de este trabajo, por la confianza que me confirió y por todo lo bueno que me dejó en este laboratorio, además del brindarme el gusto por la investigación, de enseñarme que siempre hay alguien en quien puedes confiar y en que te apoyara en cualquier dificultad que tengas para poder superar obstáculos que se presenten en la vida

A mis compañeros del laboratorio (Diego, Angélica, Ana Lilia, Hugo, Adrián, Isabel, Fernanda y Swetia) que estuvieron conmigo en todo momento, que hicieron más divertido cada momento del laboratorio haciéndolo muy divertido y fácil, por su amistad, por su compañía, por su paciencia y por su ayuda cada vez que la necesitaba

Al personal de laboratorio que me ayudo en todo lo que podían, en mis dudas sobre la forma de trabajar en el laboratorio y por brindarme su amistad y compañía

A mis padres Margarita y Francisco

Que siempre estuvieron a mi lado, me apoyaron en todo lo que pudieron, por siempre creer en mí, por la paciencia que me tuvieron por terminar esta etapa de mi vida y por hacer este sueño hecho realidad para toda mi familia a pesar de todos los problemas existentes de esta vida

A mis hermanos Agustín y Adriana

Que siempre me ayudaron, en las buenas y en las malas, en los momentos de mayor dificultad de mi vida y hacer de este viaje más divertido con su apoyo y paciencia

A todos mis amigos que conocí y que sigo viendo a lo largo de la carrera, que estaban siempre conmigo y ayudándome en lo que podían

A mis sinodales que fueron mis profesores y que sin ellos no sería posible este trabajo y objetivo de vida

A los demás que no nombre que me apoyaban por terminar esta etapa de mi vida

A la facultad de medicina por darme la oportunidad de apoyarme en la realización de este trabajo

A la Dr. Yolanda por darme la oportunidad de trabajar en su servicio social, apoyarme en todo lo que pudo y darme la experiencia de estar en un trabajo de investigación y confiar en mí

Y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM) por darme la oportunidad de terminar la carrera de Q.F.B con el apoyo de todos los profesores que me formaron a lo largo de este tiempo tanto académicamente, moral y físicamente.

CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
MARCO TEÓRICO	11
Hábitat de <i>Coccidioides</i> spp.	11
Epidemiología.....	13
Manifestaciones clínicas de la coccidioidomicosis.....	14
Diagnóstico de la coccidioidomicosis	16
Identificación molecular de <i>Coccidioides</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
TIPO DE ESTUDIO	22
DIAGRAMA DE FLUJO.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Aislados	24
Muestras biológicas.....	26
Obtención de DNA de los aislado de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	26
Evaluación por PCR, de la especificidad del marcador SCAR ₃₀₀ utilizando DNA de aislados de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	28

Evaluación por PCR, de la sensibilidad del marcador SCAR ₃₀₀ con muestras de DNA obtenidas del aislado HU-1	29
Evaluación por PCR, de la especificidad de los marcadores SCAR ₃₀₀ , Ag2/PRA y microsatélites 621 y GAC2 con DNA obtenido de otros hongos patógenos y de <i>M. tuberculosis</i>	29
Inoculación experimental en muestras biológicas (sangre y esputo) con diferentes concentraciones de DNA de un aislado de <i>C. posadasii</i> y obtención del DNA total	29
Evaluación por PCR, de la sensibilidad de los marcadores SCAR ₃₀₀ , microsatélites GAC2 y 621, y Ag2/PRA en muestras de sangre y esputo inoculadas con DNA de <i>C. posadasii</i>	31
PCR con el marcador SCAR ₃₀₀	32
PCR con los microsatélites GAC2 y 621.....	32
PCR con el marcador Ag2/PRA	33
RESULTADOS.....	34
Obtención de DNA de los aislados de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	34
Evaluación por PCR, de la especificidad del marcador SCAR ₃₀₀ utilizando DNA de aislados de <i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>	38
Evaluación por PCR, de la sensibilidad del marcador SCAR ₃₀₀ con muestras de DNA obtenidas de <i>C. posadasii</i>	39

Evaluación por PCR, de la especificidad de los marcadores SCAR ₃₀₀ , Ag2/PRA y microsatélites 621 y GAC2 con DNA obtenido de otros hongos patógenos y <i>M. tuberculosis</i>	40
Inoculación experimental en muestras biológicas (sangre y esputo) con diferentes concentraciones de DNA de un aislado de <i>C. posadasii</i> y obtención del DNA total	42
Evaluación por PCR, de la sensibilidad de los marcadores SCAR ₃₀₀ , microsatélites GAC2 y 621, y Ag2/PRA en muestras de sangre y esputo inoculadas con DNA de <i>C. posadasii</i>	43
Sensibilidad del marcador SCAR ₃₀₀	43
Sensibilidad de los microsatélites GAC2 y 621	45
Sensibilidad del marcador Ag2/PRA.....	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS.....	58

RESUMEN

La coccidioidomicosis es una enfermedad causada por *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*, el diagnóstico convencional muchas veces es difícil, por lo que se han empleado diversos marcadores moleculares, Duarte-Escalante (2014) desarrolló un marcador SCAR que mostró ser un buen candidato para la identificación de *Coccidioides* spp, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la especificidad y sensibilidad de este marcador con diferentes muestras biológicas (sangre y esputo), y compararlo con otros marcadores moleculares descritos en la literatura y establecer las condiciones de su utilización con muestras biológicas. Se utilizaron diferentes concentraciones del DNA obtenido del aislado HU-1 de *C. posadasii*, para inocular 500 µL de sangre y esputo. Se procedió a la obtención del DNA total y se realizó la PCR con los marcadores moleculares SCAR₃₀₀, los microsatélites GAC2 y 621 (Fisher *et al.*, 2002), y la sonda desarrollada por Bialek *et al.* (2004), utilizando 5, 10 15 y 20 µL del DNA total en la mezcla de reacción para evaluar la sensibilidad y especificidad de todos los marcadores. Los resultados mostraron que todos los marcadores reconocen *Coccidioides* spp. El marcador 621 mostró la mayor sensibilidad en las muestras de sangre y esputo, mientras que el SCAR₃₀₀ evidenció una menor sensibilidad en ambas muestras biológicas. Aunque el marcador SCAR₃₀₀ mostró menor sensibilidad que el 621, éste puede ser utilizado como auxiliar en el diagnóstico de la coccidioidomicosis.

INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis o fiebre del Valle de San Joaquín es una enfermedad causada por hongos del género *Coccidioides*, con dos especies descritas: *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* (Fisher *et al.*, 2002).

De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (VIENNA CODE), la clasificación taxonómica formalmente aceptada para las especies *C. immitis* y *C. posadasii* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae

Género: *Coccidioides*

Especies: *C. immitis* y *C. posadasii*

Las áreas endémicas para estos hongos comprenden, el sureste de Estados Unidos, que incluyen las regiones centrales del desierto de Arizona, el Valle de San Joaquín en California y extensas zonas áridas de Nevada, Nuevo México, Texas y Utah (Chiller *et al.*, 2003; Hector *et al.*, 2011). En México, los principales estados endémicos para la coccidioidomicosis son Baja California, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas (Baptista y Riquelme, 2007; Laniado-Laborín, 2007). En algunos países de Centro y Sudamérica también existen zonas endémicas, además, en países como Argentina y la zona norte de Brasil, se ha incrementado el número de casos de esta enfermedad en los últimos años (Canteros *et al.*, 2010, 2010a; Cordeiro *et al.*, 2010; Hector y Laniado, 2005; Laniado-Laborín, 2007a).

Coccidioides spp. son hongos patógenos, que se desarrollan en suelos con pH alcalino, ricos en sales y pobres en nutrientes, en áreas donde el clima generalmente es seco, con un rango de precipitación de 100 a 500 mm por año (Kolivras *et al.*, 2001) y con presencia de vegetación xerófita (Welsh *et al.*, 2012). La humedad en el suelo favorece al crecimiento del hongo, dando lugar a la fase filamentosa, en la que se desarrollan hifas septadas, que forman los artroconidios, que son dispersados en el ambiente por los vientos o por actividad humana en las zonas cercanas. Esta fase presenta una alta resistencia para sobrevivir en el medio ambiente, permitiéndole al hongo permanecer viable por meses o años. Los artroconidios, al entrar en contacto con un hospedero (mamíferos, reptiles, etc.) principalmente por inhalación, se alojan en los pulmones, cambiando a esférulas que son estructuras esféricas con un tamaño de 80 a 200 μm (fase parasitaria) y en su interior se forman las endosporas, las cuales son liberadas al romperse las esférulas, éstas son diseminadas hacia tejidos vecinos, dando origen a su vez, a nuevas esférulas, repitiendo el ciclo en el hospedero (Reyes-Montes *et al.*, 2016). La coccidioidomicosis puede afectar a casi cualquier persona, sin embargo, las actividades al aire libre realizadas por campesinos, personal de la construcción, deportistas, etc., en las zonas endémicas, representan un mayor riesgo para contraer la infección (Nguyen *et al.*, 2013).

Su diagnóstico, se ha fundamentado tradicionalmente, en los resultados de una combinación de datos clínicos como, la intradermorreacción, el aislamiento del agente causal en muestras clínicas, estudios de gabinete y diagnóstico de laboratorio. Dado que el hongo crece de forma lenta, se requieren de métodos rápidos para su identificación, como son las técnicas serológicas convencionales,

que detectan anticuerpos específicos, tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo (Negroni *et al.*, 2010). Otros métodos utilizan técnicas de identificación molecular, como la PCR, usando diferentes marcadores moleculares (Pan *et al.*, 1995; Assi *et al.*, 2007; Pounder *et al.*, 2006; Tintelnot *et al.*, 2007; Binnicker *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de los numerosos marcadores moleculares que se han desarrollado para la identificación de estos hongos, todos han mostrado ciertas ventajas y desventajas, y no existe aún un marcador estandarizado que se utilice de manera rutinaria en los laboratorios clínicos para el diagnóstico de la enfermedad. Recientemente, Duarte-Escalante (2014), desarrolló un marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), denominado SCAR₃₀₀, que mostró ser un buen candidato para la identificación de *Coccidioides* spp., por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la especificidad y sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ en muestras de sangre y esputo y compararlo con otros marcadores moleculares descritos en la literatura para establecer las condiciones de su utilización con muestras biológicas.

MARCO TEÓRICO

Hábitat de *Coccidioides* spp.

Los primeros trabajos en describir el hábitat de *Coccidioides* spp., fueron realizados por Elconin *et al.* (1964) y Egeberg *et al.* (1964), quienes describieron las características del suelo en zonas endémicas, ellos encontraron que el hongo podía crecer con altas concentraciones de sales solubles, como las sales de calcio, magnesio, sodio, cloruros y sulfatos y soportar altas temperaturas,

sugiriendo que estas condiciones son óptimas para el crecimiento del hongo y podrían llegar a inhibir o disminuir la competencia con otros microorganismos. Otros autores, también han descrito que el hábitat para estos hongos son regiones desérticas, áridas y cálidas en el continente americano con zonas que presentan veranos calientes, inviernos suaves sin congelaciones severas, precipitación anual de entre 100-500 mm, suelos alcalinos y arenosos. Además, que estos hongos se desarrollan comúnmente alrededor de 10-30 cm debajo de la superficie (Fisher *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2015).

El ciclo de vida *Coccidioides* spp. está estrechamente relacionado con los cambios en las condiciones climáticas. La fase micelial necesita humedad en el suelo para crecer, de ahí que el hongo se recupere principalmente en la primavera después de las precipitaciones y cuando el invierno ha terminado. Después de este periodo, las hifas necesitan un período seco para promover la formación y desarticulación de los artroconidios y pueden dispersarse en el aire en forma de aerosoles, los cuales pueden ser inhalados por un hospedero, principalmente mamífero. Esto explica en parte, el incremento en la tasa de infección causada por *Coccidioides* en los meses más secos del año (Lewis *et al.*, 2015).

Asimismo, estudios realizados por Cordeiro *et al.* (2010) para el estado de Ceará en el noroeste de Brasil y De Macêdo *et al.* (2011) en los estados Caridade do Piauí y Elesbão Veloso, reportaron características similares a las descritas para el hábitat de *Coccidioides* spp., con un clima semidesértico, suelos arenosos, ricos en sales, con pH de 4.1-8.6 y encontrando al hongo en profundidades de 10-40 cm, en el suelo. Además, Cordeiro *et al.* (2010) encontraron que las infecciones

por *Coccidioides*, se relacionaron con la caza de los armadillos, concluyendo que el hongo se encontraba asociado con los armadillos y sus madrigueras.

Epidemiología

Los reportes de pacientes hospitalizados por esta enfermedad en las últimas décadas, muestran que los grupos más afectados son, varones de 50 años, filipinos, afroamericanos, personas embarazadas, personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida y otros individuos inmunocomprometidos (Johnson *et al.*, 2014). La incidencia de la coccidioidomicosis se ha asociado con el origen étnico, el estado inmune del hospedero y la ocupación, así como personas que trabajan en ciertos ambientes exteriores, tal como trabajadores de la construcción, quienes han mostrado ser una población susceptible para contraer la enfermedad por el riesgo de exposición al hongo en zonas endémicas (Wilken *et al.*, 2015).

Un estudio reciente realizado por Luo *et al.* (2016) en Estados Unidos, mostró que la tendencia de hospitalización en pacientes con coccidioidomicosis se ha incrementado en los últimos años. Durante un periodo de 8 años, identificaron 30,870 hospitalizaciones de pacientes con coccidioidomicosis, de los cuales 29,584 fueron adultos y 286 niños. Sus resultados evidenciaron que el número de hospitalizaciones fue variable, sin embargo aumentó en conjunto, con picos más altos en 2009 y 2011. Asimismo, las hospitalizaciones se identificaron en 46 estados, pero los estados con más casos fueron Arizona (49,1%), seguido de California (36.8%), Texas (3.3%) y Nevada (1.6%). Por otro lado, también mostraron que la mortalidad hospitalaria se asoció con los grupos de edad entre 61 y > 70 años.

En México, dado que desde 1994, la coccidioidomicosis dejó de ser una enfermedad de notificación obligatoria, no existen datos epidemiológicos fidedignos que nos indiquen el número de casos en el país. Sin embargo, Laniado-Laborín (2007) sugiere, de acuerdo con encuestas de pruebas cutáneas realizadas en México, que las infecciones por *Coccidioides* spp. son tan prevalentes como en las áreas endémicas de los Estados Unidos. Asimismo, un trabajo realizado por Mondragón-González *et al.* (2005), en el que aplicaron pruebas cutáneas con coccidioidina y encuestas de prevalencia de la infección, mostraron tasas de 10% (Tijuana, Baja California, 1991), 40% (Torreón, Coahuila, 1999) y 93% (en 12 comunidades en el estado de Coahuila, 2005).

Por otro lado, un estudio reciente realizado por Corzo-León *et al.* (2015), en el cual estimaron las tasas de infecciones fúngicas serias, encontraron que las más prevalentes son la candidiasis vulvovaginal recurrente (5,999/100,000), seguido de la aspergilosis broncopulmonar alérgica (60/100,000), aspergilosis pulmonar crónica (15,9/100,000), queratitis micótica (10,4/100,000), candidiasis invasiva (8,6/100,000) y la coccidioidomicosis (7,6/100,000). Los autores mencionan que éstas se encuentran asociadas con altas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que apoya la importancia de la coccidioidomicosis en México.

Manifestaciones clínicas de la coccidioidomicosis

El espectro de la coccidioidomicosis es muy amplio y está asociado de manera importante a las defensas del hospedero, al tamaño del inóculo, y posiblemente a la virulencia del hongo, entre otros factores. Aproximadamente el 60% de las infecciones clínicas ocurren con pocos o ningún síntoma respiratorio, mientras que

el 40% de los pacientes que son sintomáticos pueden presentar una enfermedad aguda o subaguda, que puede ir desde un cuadro similar a una gripe hasta una neumonía progresiva. Los síntomas generalmente inician dentro de 7 a 21 días después de la inhalación de los artroconidios. Los pacientes sintomáticos pueden presentar fiebre, tos, malestar en el pecho y fatiga, estos síntomas generalmente duran menos de 3 semanas, aunque puede haber fatiga prolongada con manifestaciones cutáneas transitorias, incluyendo erupción cutánea y eritema nodoso, en 10 a 50% de los pacientes. En aproximadamente el 25% de los casos de enfermedad pulmonar, ésta será similar a otras neumonías adquiridas por causas diferentes, es decir con dolor pleurítico, tos (por lo general no productiva), fiebre, artralgias y mialgias. Sin embargo, puede desarrollarse una neumonía progresiva, la cual puede involucrar a la pleura y necrosis con cavitación. La mayoría de los pacientes con una amplia participación pulmonar no tienden a una enfermedad extrapulmonar. Por lo que respecta a la coccidioidomicosis diseminada, se estima que ocurre en menos del 5% de los pacientes sintomáticos (Saubolle *et al.*, 2007).

Así mismo, *Coccidioides* spp. puede invadir las meninges de la base del cráneo, manifestándose cefalea, que aparece hasta en 75% de los casos, también existen pacientes que presentan síntomas neurológicos focales como ataxias, alteraciones de la marcha, diplopía o parálisis facial central (Matuk *et al.*, 2014).

Se ha mostrado que los pacientes de origen étnico negro o asiático (especialmente filipino), las mujeres embarazadas en el tercer trimestre, y cualquier paciente inmunocomprometido, tienen mayor riesgo para desarrollar la enfermedad diseminada. La diseminación es un evento clínico temprano,

fundamentalmente extrapulmonar, y los sitios involucrados incluyen piel, ganglios linfáticos, huesos, articulaciones y el sitio afectado más grave es el sistema nervioso central (Stockamp y Thompson, 2016).

Diagnóstico de la coccidioidomicosis

El diagnóstico de la coccidioidomicosis durante las últimas décadas, se ha fundamentado tradicionalmente, en los resultados de una combinación de datos clínicos, estudios de gabinete y de laboratorio. Los estudios de gabinete (imagenológicos) usualmente proporcionan un diagnóstico presuntivo, mientras que los procedimientos de laboratorio son necesarios para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad. El diagnóstico decisivo se realiza, de preferencia, por el aislamiento del agente causal en las muestras clínicas, pero puede ser difícil en las primeras etapas de la enfermedad; ya que el crecimiento del hongo es lento y hay que esperar hasta seis semanas para identificarlo en cultivo. Tales inconveniencias hacen necesario recurrir a métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la presencia del agente etiológico o de sus productos, en muestras del paciente.

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de la coccidioidomicosis son muy importantes y quizá las más frecuentemente empleadas, entre estas se encuentran la prueba de precipitación en tubo (PT) y el ensayo de fijación del complemento (FC). Cada una depende de un antígeno específico, para la PT, ahora es conocido que se trata de una β -glucosidasa de 120 kDa, estable al calor, mientras que para la FC, es una quitinasa lábil al calor (Hung *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 1993). Los ensayos de PT detectan una inmunoglobulina de tipo IgM y son

positivos al inicio de la enfermedad y, a veces, durante la recurrencia. Mientras que los ensayos de FC suelen ser positivos, por lo general después de 2-3 semanas de la enfermedad, detectan IgG, y su título tiene implicaciones pronósticas, ya que altos títulos, auguran una enfermedad grave o diseminada. En las personas que resuelven su enfermedad clínica, ambas reacciones se vuelven negativas con el tiempo. Además, se ha utilizado el inmunoensayo enzimático (EIA), el cual ha mostrado una especificidad del 98.5% y una sensibilidad de 95.5% (Ampel, 2015).

El análisis histopatológico de tejido es otra opción diagnóstica, pero su buena interpretación depende del muestreo adecuado, de la experiencia del observador y de la técnica histoquímica apropiada (Muñoz-Hernández *et al.*, 2008). De manera que, se ha hecho necesario el desarrollo de pruebas que permitan descartar mimetismo antigénico o morfológico de este organismo con otros agentes que producen cuadros clínicos similares (Millar *et al.*, 2003).

Por otro lado, el análisis con base en la detección de la huella genética del hongo puede ser una herramienta útil para el diagnóstico, debido a su rapidez y especificidad, sin el requisito del crecimiento del organismo o de confiar en la respuesta del hospedero. Sin embargo, a pesar de numerosos marcadores moleculares que han sido diseñados para la identificación de *Coccidioides* spp., a la fecha, éstos no están disponibles comercialmente, y menos aún, estandarizados para su utilización en laboratorios de rutina diagnóstica.

Identificación molecular de *Coccidioides*

El trabajo orientado a la identificación de las dos especies del género *Coccidioides*, fue el realizado por Fisher *et al.* (2002) quienes a través de la utilización de microsatélites, mostraron que, los denominados GAC2 y 621, eran diagnósticos para las especies *C. immitis* y *C. posadasii*. 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. Greene *et al.* (2000), diseñaron oligonucleótidos con base en la región ITS (Internal Transcribed Spacer) para *C. immitis*, pero no reportaron la secuencia en *C. posadasii*. Asimismo, Tintelnot *et al.* (2007) diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de las regiones ITS del rDNA (NS7-ITS2, ITS1-ITS4, ITS2-ITS5, ITS3-ITS4, ITS4-ITS5, ITS3-R635 y F63-R635) y de todos los oligonucleótidos probados, sólo los ITS3 y 4 diferenciaron las dos especies. Sin embargo, a pesar de los marcadores moleculares desarrollados hasta el momento, ninguno ha sido estandarizado para ser utilizado en la identificación especie-específica, por lo que se continúa en la búsqueda de éstos.

Por otro lado, varios investigadores han obtenido marcadores SCAR a partir de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), y RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), estos marcadores son diseñados con base en una secuencia conocida del genoma del organismo en estudio, pueden representar un solo locus

en el genoma. Los marcadores SCAR resultan útiles en la construcción de bibliotecas genómicas, en el control biológico para estudiar la persistencia de cepas en el ambiente y en la identificación de híbridos en plantas. Este tipo de marcadores son una herramienta importante para el desarrollo de ensayos sensibles y específicos que pueden ser utilizados para identificar hongos, como ha sido descrito por varios autores (Abbasi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Linde *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001, 2002).

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

Duarte-Escalante (2014), obtuvo un marcador SCAR denominado SCAR₃₀₀, a partir de patrones polimórficos generados por AFLP, en los cuales se identificaron bandas compartidas en ambas especies de hongos. Posteriormente, éstas fueron reamplificadas, clonadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de hongos depositadas en el GenBank para descartar homología con otros hongos patógenos y con base en este análisis, se acotaron las secuencias iniciales de los fragmentos clonados, eliminando las secuencias compartidas y se diseñaron los oligonucleótidos específicos, este marcador solo reconoció a las dos especies de *Coccidioides* y presentó alta sensibilidad, por lo que éste fue evaluado como herramienta diagnóstica en la identificación de *Coccidioides* spp. en muestras biológicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, existen pocos estudios clínico-epidemiológicos que permitan determinar la frecuencia de la coccidioidomicosis, ya que desde 1994 dejó de ser una enfermedad de reporte obligatorio. Sin embargo, de acuerdo con datos epidemiológicos de la coccidioidomicosis en México, previos a esta fecha, estiman anualmente más de 1500 casos de coccidioidomicosis primaria y 15 casos de enfermedad diseminada. Por lo que se sugiere que la situación actual de la enfermedad puede haber seguido un desarrollo parecido al de los Estados Unidos, donde las altas tasas de prevalencia e incidencia se dispararon a partir del inicio de la década de los noventa.

Por otro lado, la coccidioidomicosis comparte características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas con otras enfermedades de etiología fúngica y no fúngica, lo que dificulta su tratamiento en caso de no contar con los medios diagnósticos adecuados. El diagnóstico convencional de la coccidioidomicosis se realiza con base en estudios de gabinete (clínicos y radiológicos), de laboratorio y en la identificación del hongo mediante un examen directo en fresco o teñido con diferentes técnicas y/o a través del cultivo de muestras biológicas del paciente, lo que puede tardar varios días o semanas. Estos inconvenientes hacen necesario recurrir a métodos más rápidos, precisos y sensibles que permitan evidenciar la presencia del agente etiológico en muestras clínicas, como son los marcadores moleculares, sin embargo a pesar de que se han desarrollado varios marcadores, ninguno ha sido estandarizado para ser utilizado de manera rutinaria en el diagnóstico de esta enfermedad. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la especificidad y sensibilidad del marcador molecular SCAR₃₀₀, en muestras

biológicas (sangre y esputo) inoculadas experimentalmente con DNA de *C. posadasii* y su eficiencia se comparó contra la de otros marcadores moleculares descritos en la literatura.

HIPÓTESIS

Si el marcador molecular SCAR₃₀₀ es específico y sensible entonces permitirá identificar DNA de *Coccidioides* spp. en muestras biológicas (sangre y esputo)

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la especificidad y sensibilidad del marcador molecular SCAR₃₀₀ para identificar DNA de *Coccidioides* spp. en muestras biológicas (sangre y esputo)

OBJETIVOS PARTICULARES

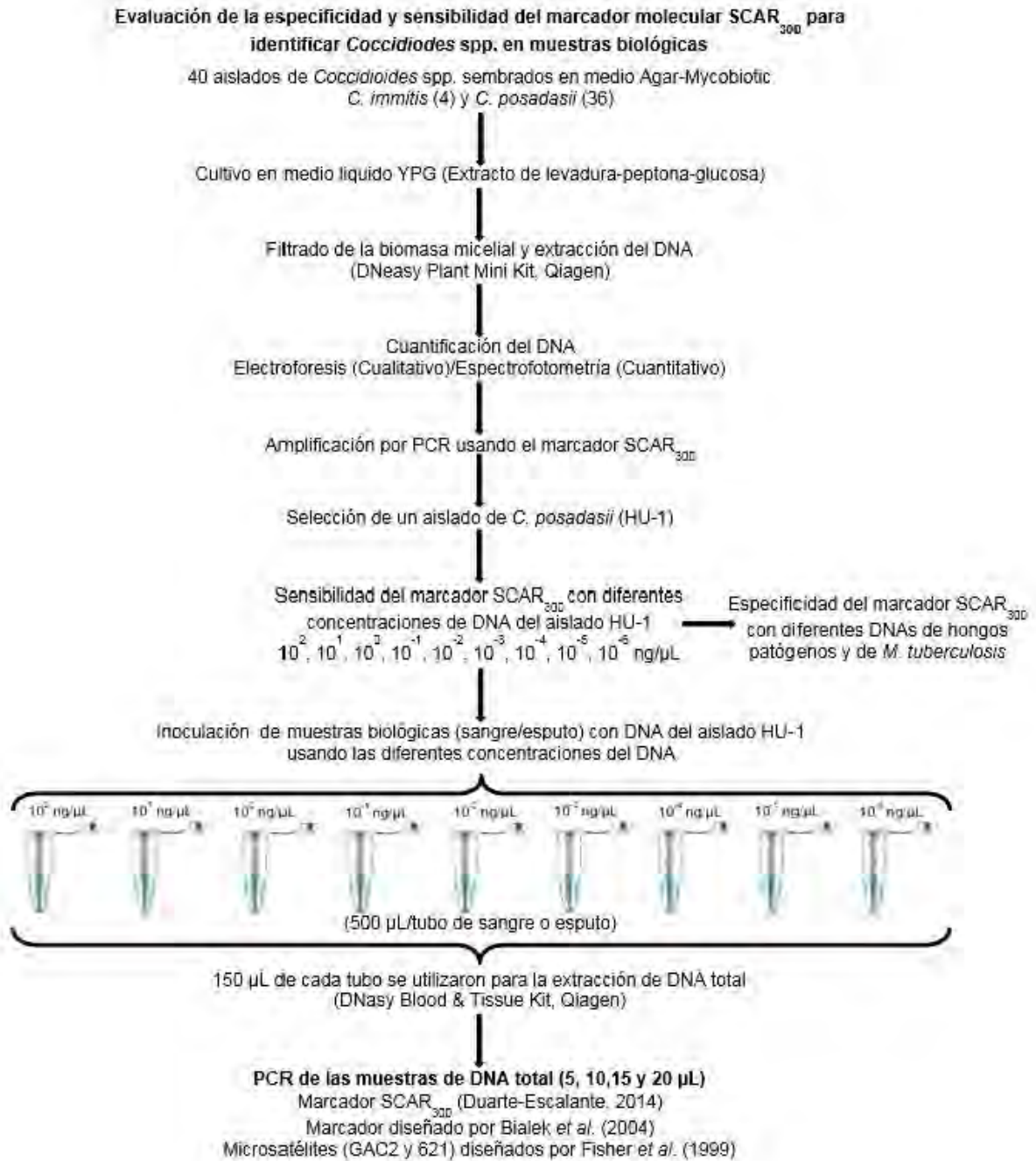
1. Corroborar por PCR, la especificidad del marcador SCAR₃₀₀ utilizando DNA de diferentes aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*, y DNA de hongos patógenos relacionados (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *Sporothrix schenckii* y *Candida glabrata*) y *Mycobacterium tuberculosis*
2. Determinar por PCR, la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ utilizando diferentes concentraciones de DNA de un aislado de *C. posadasii*
3. Determinar por PCR, la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ en muestras de sangre total inoculadas con diferentes concentraciones de DNA de un aislado de *C. posadasii*

4. Determinar por PCR, la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ en muestras de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de DNA de un aislado de *C. posadasii*
5. Comparar la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ en muestras de sangre y esputo, contra la sensibilidad del marcador *Ag2/PRA* (Bialek *et al.*, 2004) y los microsatélites GAC2 y 621 (Fisher *et al.*, 2002).

TIPO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio prospectivo, experimental y analítico.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados

Se utilizaron 40 aislados, cuatro correspondientes a *C. immitis* y 36 a *C. posadasii*, obtenidos de la colección de cepas del Laboratorio de Micología Molecular, Unidad de Micología, Facultad de Medicina, UNAM (Tabla 1). Todos los aislados se sembraron en tubos con agar-Mycobiotic® (Bioxon, México), y se incubaron a 28°C durante 5 días o hasta observar buen crecimiento para los ensayos posteriores.

Tabla 1. Aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*

Aislado	Especie
LA	<i>C. immitis</i>
HJ	<i>C. immitis</i>
M40-05	<i>C. immitis</i>
62	<i>C. immitis</i>
43.3	<i>C. immitis</i>
ZVJ	<i>C. posadasii</i>
QR (deltoides)	<i>C. posadasii</i>
QR (pie)	<i>C. posadasii</i>
M39-05	<i>C. posadasii</i>
M54-06	<i>C. posadasii</i>
073129	<i>C. posadasii</i>
GGM	<i>C. posadasii</i>

HU-1	<i>C. posadasii</i>
ANJ	<i>C. posadasii</i>
QR (rodilla)	<i>C. posadasii</i>
083376	<i>C. posadasii</i>
M56-08	<i>C. posadasii</i>
HU-24	<i>C. posadasii</i>
HU-18	<i>C. posadasii</i>
083377	<i>C. posadasii</i>
5256	<i>C. posadasii</i>
MA	<i>C. posadasii</i>
073089	<i>C. posadasii</i>
HU-12	<i>C. posadasii</i>
073130	<i>C. posadasii</i>
083382	<i>C. posadasii</i>
M28-05	<i>C. posadasii</i>
M30-05	<i>C. posadasii</i>
M57-08	<i>C. posadasii</i>
37.3	<i>C. posadasii</i>
073131	<i>C. posadasii</i>
HU-2	<i>C. posadasii</i>
M12-04	<i>C. posadasii</i>
M23-05	<i>C. posadasii</i>
HU-11	<i>C. posadasii</i>

972579	<i>C. posadasii</i>
073094	<i>C. posadasii</i>
083380	<i>C. posadasii</i>
083381	<i>C. posadasii</i>
EM	<i>C. posadasii</i>

Muestras biológicas

Se utilizaron muestras de sangre total y esputo, obtenidas de un donante humano inmunocompetente.

Obtención de DNA de los aislado de *C. immitis* y *C. posadasii*

Los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* fueron crecidos en agar-Mycobiotic® (Bioxón, MX) y resembrados en matraces con medio líquido YPD (extracto de levadura 10%-peptona10%-dextrosa 20%) durante 7-10 días a 28°C para obtener la biomasa micelial de cada aislado. Cada micelio se cosechó por filtración al vacío, y se utilizó papel filtro estéril. El micelio se lavó con agua estéril Milli-Q (Millipore, FR) para eliminar residuos del medio de cultivo y se secó el micelio con papel filtro estéril.

El procedimiento para la extracción del DNA se llevó a cabo con el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, EUA) como se describe a continuación: se tomaron 100 mg de la biomasa micelial y se depositaron en tubos estériles de 1.5 mL, conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio (400-455 µm), se agregaron 400 µL de amortiguador de lisis AP1 a cada tubo. Los tubos se procesaron en el equipo FastPrep® (Thermo Savant Instruments, EUA) con 4 periodos de 40 s a 6 m/s con

5 minutos de enfriamiento en hielo entre cada periodo. A continuación, se adicionaron 4 μL de RNAsa (100/mL), se agitó vigorosamente en el vórtex (Daigger, EUA) y se incubó la mezcla por 10 minutos a 65°C, mezclando 2 o 3 veces por inversión. Después de la incubación, se adicionaron 130 μL del amortiguador P3 y se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a una columna lila QIAshredder mini spin colocada en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 14 000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante obtenido se cuantificó y se transfirió a un tubo nuevo, se adicionaron 1.5 volúmenes del amortiguador AW1 y se mezcló con la ayuda de la micropipeta hasta obtener una mezcla homogénea. Se tomaron 650 μL de esta mezcla y se transfirieron a una columna blanca DNeasy mini spin colocada en un tubo colector de 2 mL, se centrifugó por 1 minuto a 9000 rpm, desechando el sobrenadante obtenido, este paso se repitió hasta acabar con todo el volumen. Posteriormente, se cambió el tubo colector, y se realizaron dos lavados con 500 μL del amortiguador AW2, el primero se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm y el segundo lavado a 14 000 rpm por 2 minutos. Para eliminar el exceso del amortiguador AW2, se centrifugó la columna spin por 1 minuto a 8 000 rpm. Por último, para eluir el DNA, la columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL, adicionando a la columna spin 100 μL de agua Milli-Q sobre la membrana, dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 8 000 rpm. Se realizó una segunda elución con 50 μL de agua Milli-Q.

La concentración de los DNA obtenidos se determinó por espectrofotometría (Spectrophotometer DS-11, DeNovix, EUA) y por electroforesis en gel de agarosa al 1%, comparando contra diferentes concentraciones (20, 50 y 100 ng/ μL) del

fago λ (GIBCO BRL®, EUA). Antes de cargar cada muestra de DNA en el gel, se mezcló con 2 μ L de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium, EUA) diluido (3:1000) con el amortiguador de carga 6X (0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v xileno cianol FF, 30% v/v glicerol).

El corrimiento electroforético se realizó a 100 V en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM). La imagen se capturó en un Transiluminador M-20 MultiDoc-IT™ Imaging System UVP (Upland, EUA). Los DNAs fueron conservados a 4 °C hasta su uso.

Evaluación por PCR, de la especificidad del marcador SCAR₃₀₀ utilizando DNA de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*

Para corroborar la eficiencia del marcador SCAR₃₀₀, éste fue probado con todos los DNAs obtenidos de aislados de *Coccidioides* incluidos en el estudio. Las condiciones para la PCR fueron las descritas por Duarte-Escalante (2014): la mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 25 μ L, la cual consistió en dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 2 mM, 100 pmol de cada oligonucleótido SCAR₃₀₀-F (5'-AATGGCGTTAAGTGGGTC-3') y SCAR₃₀₀-R (5'-AAGCCACTTACACAATCCAG-3') y 1U de *Taq* polimerasa en amortiguador 1X. El programa de amplificación fue: un ciclo a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 1 minutos y un ciclo de extensión a 72 °C por 5 minutos.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift® Maxi™ Thermal Cycler Block (Esco, Singapur). Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5% con amortiguador TBE 0.5X a 100 V por 60 minutos.

Se utilizó el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA) para determinar el tamaño molecular de los productos. El gel se visualizó en un fotodocumentador M-20 MultiDoc-IT™ Imaging System UVP (Upland).

Evaluación por PCR, de la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ con muestras de DNA obtenidas del aislado HU-1

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectado por PCR con el marcador SCAR₃₀₀, se utilizaron diferentes concentraciones de DNA (10^2 hasta 10^{-6} ng/ μ L) obtenido del aislado HU-1, bajo las condiciones descritas anteriormente.

Evaluación por PCR, de la especificidad de los marcadores SCAR₃₀₀, Ag2/PRA y microsatélites 621 y GAC2 con DNA obtenido de otros hongos patógenos y de *M. tuberculosis*

La especificidad de los marcadores SCAR₃₀₀, Ag2/PRA y microsatélites GAC2 y 621 fue determinada por PCR según las condiciones descritas previamente, utilizando DNA del aislado HU-1, además se incluyó DNA de otros hongos patógenos (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *Sporothrix schenckii* y *Candida glabrata*) y también de *M. tuberculosis*.

Inoculación experimental en muestras biológicas (sangre y esputo) con diferentes concentraciones de DNA de un aislado de *C. posadasii* y obtención del DNA total

La sangre y esputo obtenidos del donante fueron repartidos en tubos Eppendorf, con 500 μL de sangre o esputo en cada tubo. Cada tubo fue inoculado con una de las concentraciones seriadas de DNA obtenido del aislado HU-1 de *C. posadasii*. Las concentraciones utilizadas se prepararon a partir de una concentración de 10^3 ng/ μL , para obtener: 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} ng/ μL . Posteriormente, 30 μL de cada una de estas concentraciones, fue inoculada en los tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían los 500 μL de sangre o esputo.

Cada uno de los tubos con sangre o esputo inoculados con las diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1, fue procesado de manera independiente para la obtención de DNA total, usando el kit comercial DNasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), como se describe a continuación.

Se utilizaron 150 μL de cada tubo, conteniendo la mezcla de sangre o esputo adicionado del DNA del aislado HU-1 y se transfirieron a tubos de 2 mL conteniendo 0.2 g de perlas de vidrio estériles, se agregó 20 μL de proteinasa K (20 mg/ μL). Las muestras se procesaron en el FastPrep (Thermo Savant Instruments) por 4 ciclos de 40 s a 4.0 m/s con 5 minutos de enfriamiento en hielo entre cada periodo. Posteriormente se adicionaron 200 μL de amortiguador AL, mezclando vigorosamente con ayuda de una micropipeta para lograr una solución homogénea y se incubó a 56°C por 10 minutos. Después del periodo de incubación, se adicionaron 200 μL de etanol (96-100%) a cada muestra y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. Cada mezcla fue transferida a una columna spin de 2 ml, colocada dentro de un tubo colector y se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min. Se desechó el filtrado del tubo colector y la columna spin se colocó en un nuevo tubo colector. Se agregaron 500 μL de amortiguador AW2 a

la columna spin y se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 minutos para secar la membrana. Por último, el filtrado y el tubo colector se desecharon y la columna spin se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml, evitando el contacto con el etanol filtrado. Se agregaron 200 mL de agua Milli-Q en el centro de la membrana de la columna spin, y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto, después se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 minuto para eluir el DNA.

Para corroborar la presencia de DNA en todas las muestras se procedió a determinar la concentración a través electroforesis en gel de agarosa al 1%, comparando contra diferentes concentraciones (20, 50 y 100 ng/ μ L) del fago λ (GIBCO BRL®). Antes de cargar cada muestra de DNA en el gel, se mezclaron con 2 μ L de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium) diluido (3:1000) con el amortiguador de carga 6X (0.25% p/v azul de bromofenol, 0.25% p/v xilene cianol FF, 30% v/v glicerol).

El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V en amortiguador TBE 0.5X (Tris-Base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM). La imagen se capturó en un Transiluminador M-20 MultiDoc-IT™ Imaging System UVP (Upland).

Evaluación por PCR, de la sensibilidad de los marcadores SCAR₃₀₀, microsatélites GAC2 y 621, y Ag2/PRA en muestras de sangre y esputo inoculadas con DNA de *C. posadasii*

Una vez cuantificado el DNA total, obtenido de las muestras biológicas (sangre y esputo) inoculadas experimentalmente con DNA del aislado HU-1, se procedió a realizar los ensayos de PCR con los diferentes marcadores moleculares (SCAR₃₀₀, Ag2/PRA y los microsatélites GAC2 y 621). En todos los ensayos de PCR, en un

volumen de reacción total de 50 μ L, se utilizaron cuatro volúmenes diferentes (5, 10, 15 y 20 μ L) del DNA total obtenido de la sangre o esputo inoculados con DNA de *C. posadasii*.

PCR con el marcador SCAR₃₀₀. Para realizar la PCR con el marcador SCAR₃₀₀, se utilizaron 5, 10, 15 y 20 μ L del DNA total obtenido de la sangre y esputo inoculados con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1, en un volumen de reacción de 50 μ L, con las mismas condiciones descritas anteriormente.

PCR con los microsatélites GAC2 y 621. Para los ensayos de PCR con los microsatélites GAC2 y 621 (Fisher *et al.*, 2002), las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguientes: se utilizó un volumen de reacción de 50 μ L, conteniendo amortiguador 1X, 200 μ M de dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 2.5 mM de MgCl₂, 1.0 U de *Taq* polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 100 pmol de cada oligonucleótido GAC2-F (AGGATGCGACCGTCCGAGC), GAC2-R (TTTGCGGGAGAATGGCTTCC) y volúmenes de 5, 10, 15 ó 20 μ L del DNA total obtenido de la sangre y esputo inoculados con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1. Se procedió de la misma manera para la PCR con los oligonucleótidos 621-F (ACAATGAACGAGCAGCAAGG) y 621-R (TGAAAGATGTGTAGACCCGA). Para ambos microsatélites, se utilizó el siguiente programa: un ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 5 minutos, 72°C por 5 minutos y un ciclo terminal de 4°C por 5 minutos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift® Maxi™ Thermal Cycler Block (Esco). Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5% con amortiguador TBE 0.5X a 100 V por

60 minutos. Se utilizó el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen) para determinar el tamaño molecular de los productos. El gel se visualizó en un Transiluminador M-20 MultiDoc-IT™ Imaging System UVP (Upland).

PCR con el marcador *Ag2/PRA*. Para el método descrito por Bialek *et al.* (2004), las condiciones fueron las siguientes: para la primera reacción de PCR, se utilizaron 5, 10, 15 y 20 µL del DNA total obtenido de la sangre y esputo inoculados con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1, en un volumen de reacción de 50 µL, conteniendo amortiguador 1X, 200 µM de dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 2.5 mM de MgCl₂, 1.0 U de *Taq* polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y 100 pmol de cada oligonucleótido, CoI (5'-GTACTATAGGG AGGATAATCGTT-3') y CoII (5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3'). Se utilizó el siguiente programa: un ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s y 72°C por 1 minuto, con un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. La segunda reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL, 2 µL del producto de la primera PCR, amortiguador 1X, 200 µM de dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y 100 pmol de cada oligonucleótido, CoIII (5'-ATCCCA CCTTGCGCTGTATGTTCTGA-3') y CoIV (5'-GGAGAC GGCTGGATTTTTTAACATG-3'). Para la segunda PCR, se utilizó el siguiente programa: un ciclo a 94°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 1 minutos, con un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Esco Swift® Maxi™ Thermal Cycler Block (Esco). Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.5% con amortiguador TBE 0.5X a 100 V por 60 minutos. Se

utilizó el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen) para determinar el tamaño molecular de los productos. El gel se visualizó en un Transiluminador M-20 MultiDoc-IT™ Imaging System UVP (Upland).

RESULTADOS

Obtención de DNA de los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*

Los DNAs, obtenidos de los 40 aislados incluidos en el estudio, fueron cuantificados a través de espectrofotometría, mostraron concentraciones entre 14-460 ng/μL (Tabla 2) y la mayoría mostraron un grado de pureza aceptable con valores entre 1.7-2.0. Además, se llevó a cabo una cuantificación cualitativa para corroborar la concentración e integridad de los DNAs, a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 1a-c). Las concentraciones de todos los DNAs fueron ajustadas a 20 ng/μL, para los ensayos de PCR.

Tabla 2. Concentración de DNA de los aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*

Aislado	Especie	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
LA	<i>C. immitis</i>	124.05	2.3
HJ	<i>C. immitis</i>	309.62	1.8
M40-05	<i>C. immitis</i>	68.01	2.04
62	<i>C. immitis</i>	93.6	2.01
43.3	<i>C. immitis</i>	24.8	3.3

ZVJ	<i>C. posadasii</i>	29.0	1.9
QR (deltoides)	<i>C. posadasii</i>	56.67	1.7
QR (pie)	<i>C. posadasii</i>	14.42	1.3
M39-05	<i>C. posadasii</i>	94.65	1.4
M54-06	<i>C. posadasii</i>	36.62	2.05
073129	<i>C. posadasii</i>	100.72	1.9
GGM	<i>C. posadasii</i>	76.27	1.6
HU-1	<i>C. posadasii</i>	79.27	1.6
ANJ	<i>C. posadasii</i>	85.97	1.4
QR (rodilla)	<i>C. posadasii</i>	66.075	2.01
083376	<i>C. posadasii</i>	61.02	2.01
M56-08	<i>C. posadasii</i>	16.3	2.9
HU-24	<i>C. posadasii</i>	218.55	1.9
HU-18	<i>C. posadasii</i>	42.5	2.5
083377	<i>C. posadasii</i>	15.37	3.2
5256	<i>C. posadasii</i>	18.8	2.8
MA	<i>C. posadasii</i>	36.52	2.25
073089	<i>C. posadasii</i>	27.7	2.64
HU-12	<i>C. posadasii</i>	46.57	2.2
073130	<i>C. posadasii</i>	92.32	2.15
083382	<i>C. posadasii</i>	49.02	2.5
M28-05	<i>C. posadasii</i>	47.95	2.25
M30-05	<i>C. posadasii</i>	17.68	2.26

M57-08	<i>C. posadasii</i>	55.87	2.19
37.3	<i>C. posadasii</i>	59.22	2.2
073131	<i>C. posadasii</i>	19.55	2.5
HU-2	<i>C. posadasii</i>	35.45	2.4
M12-04	<i>C. posadasii</i>	25.25	3.2
M23-05	<i>C. posadasii</i>	36.31	2.4
HU-11	<i>C. posadasii</i>	42.05	2.3
972579	<i>C. posadasii</i>	412.05	1.7
073094	<i>C. posadasii</i>	32.92	2.2
083380	<i>C. posadasii</i>	55.77	2.1
083381	<i>C. posadasii</i>	454.42	2
EM	<i>C. posadasii</i>	14.05	3.2

La cuantificación de los DNAs obtenidos de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*, realizada por electroforesis, mostró que las concentraciones obtenidas estuvieron entre 10->100 ng/ μ L y se observó una buena calidad del DNA en la mayoría de los aislados para ser utilizado en ensayos subsiguientes (Figura 1a-c).

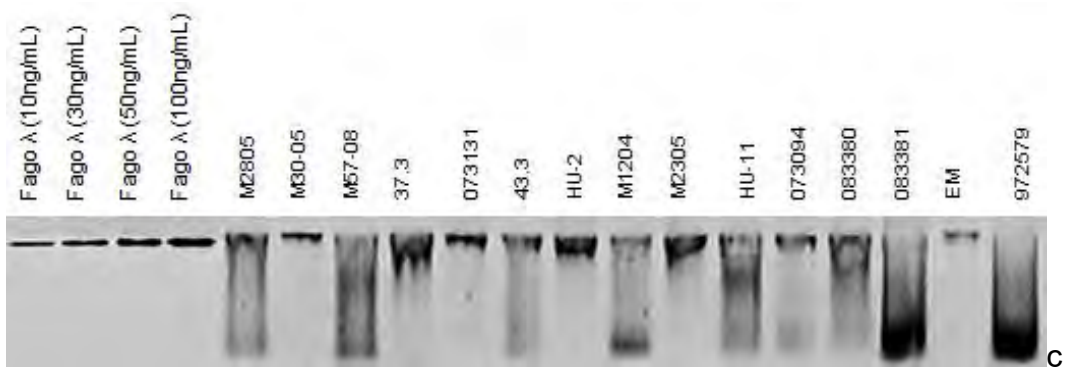
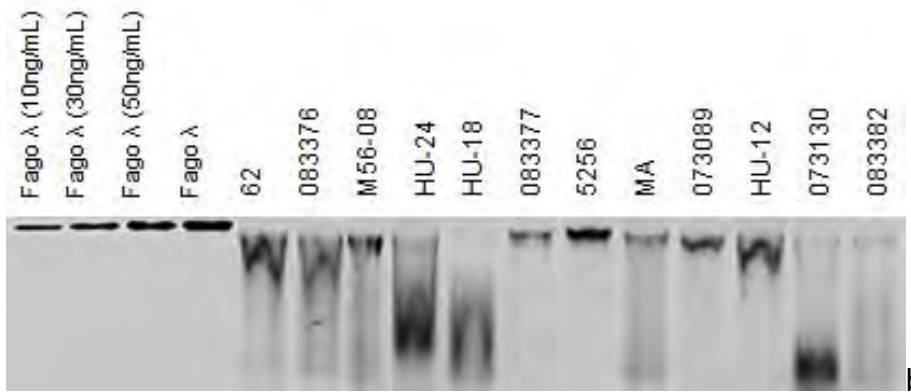
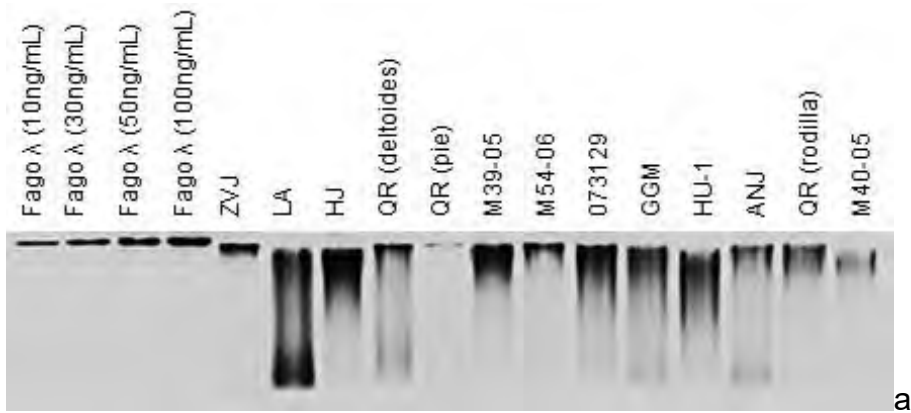


Figura 1 (a-c). Cuantificación de DNA obtenido de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*. La electroforesis se llevó en gel de agarosa al 1%, de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos. Se utilizaron concentraciones de 10, 30, 50 y 100 ng/ μ L de fago λ (GIBCO BRL®) como testigos.

Evaluación por PCR, de la especificidad del marcador SCAR₃₀₀ utilizando DNA de aislados de *C. immitis* y *C. posadasii*

Todos los DNAs de *C. immitis* y *C. posadasii* amplificaron la banda esperada de 300 pb, como se muestra en las Figuras 2a-c.

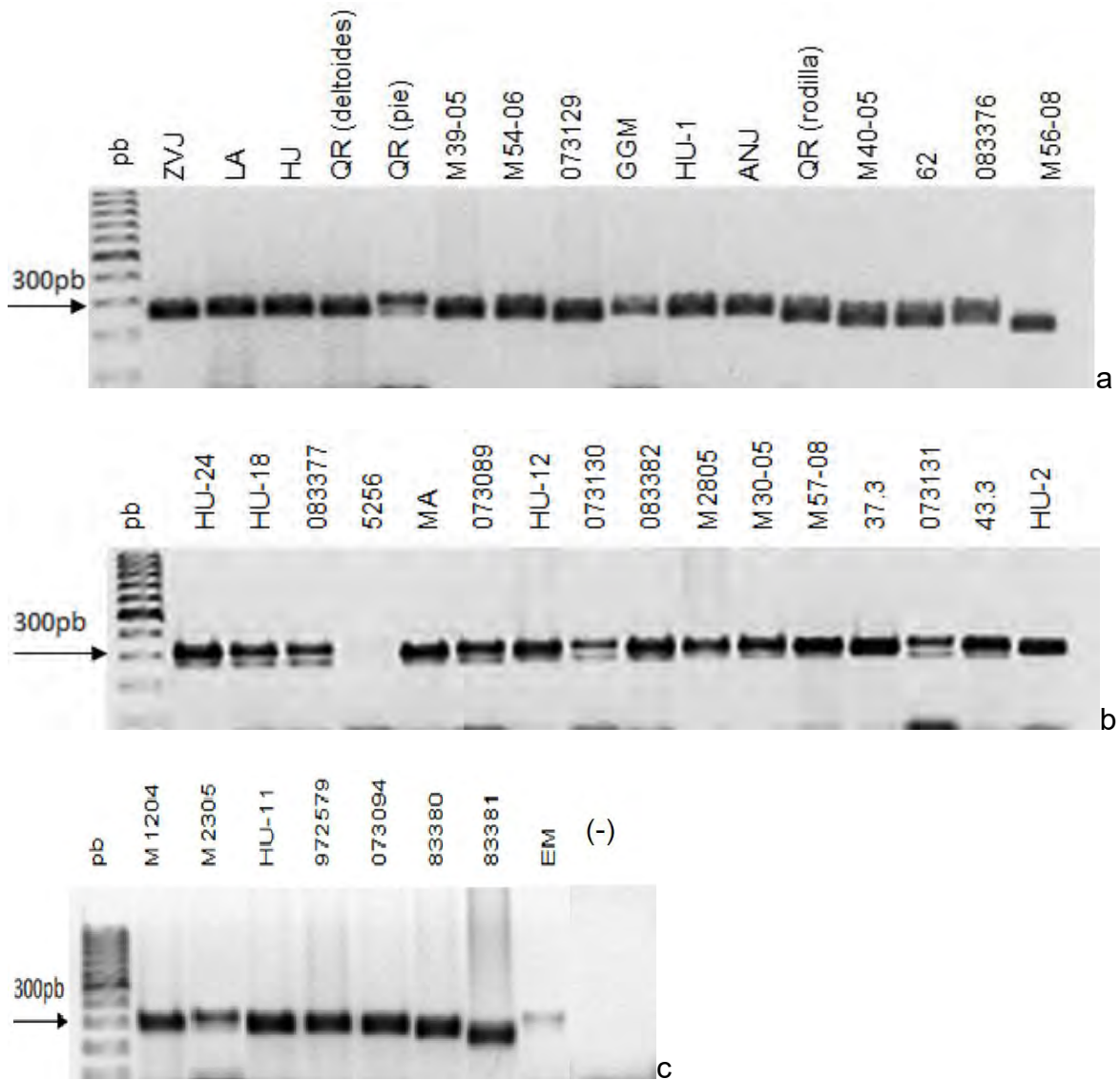


Figura 2 (a-c). PCR con el marcador SCAR₃₀₀. La PCR se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Testigo negativo (-), marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

Una vez corroborado el marcador SCAR₃₀₀, se eligió el DNA del aislado HU-1, ya que éste es un aislado de referencia que ha sido utilizado en trabajos previos. Enseguida se procedió a confirmar la calidad y cantidad del DNA del aislado HU-1 por electroforesis para utilizarlo en los ensayos siguientes (Figura 3).

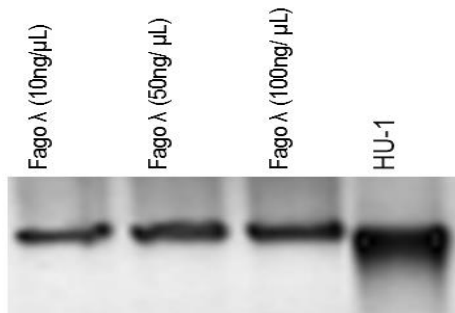


Figura 3. Cuantificación de DNA obtenido del aislado HU-1. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 1%. Se utilizaron concentraciones de 10, 50 y 100 ng/μL de fago λ (GIBCO BRL®).

Evaluación por PCR, de la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀ con muestras de DNA obtenidas de *C. posadasii*

Para determinar la cantidad mínima de DNA fúngico que puede ser detectado por PCR con el marcador SCAR₃₀₀, se amplificaron por PCR, diferentes concentraciones de DNA de un aislado de *C. posadasii* (HU-1), que fueron desde 10² hasta 10⁻⁶ ng/μL (Figura 4). Se evidenció amplificación en las tres primeras concentraciones probadas, desde 10² hasta 10⁰ ng/μL, observando el amplicón esperado de 300 pb, por lo que la sensibilidad del marcador fue de 1 ng/μL, el ensayo se realizó por duplicado para corroborar el resultado.

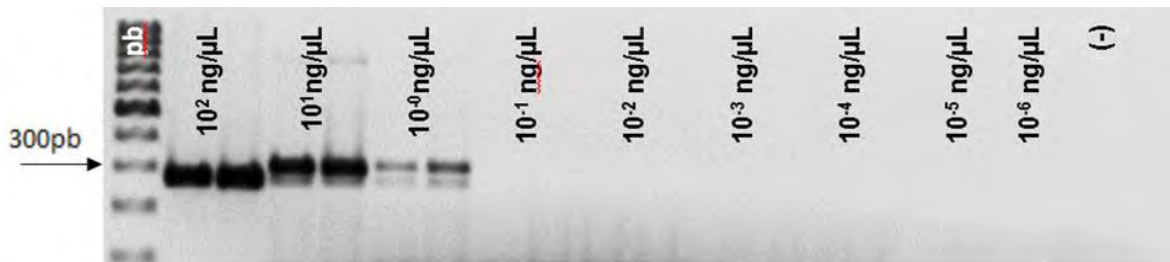


Figura 4. Evaluación de la sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀. La PCR se realizó con diferentes concentraciones de DNA del aislado de *C. posadasii* (HU-1), como se describió en materiales y métodos. Testigo negativo (-), marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

Evaluación por PCR, de la especificidad de los marcadores SCAR₃₀₀, Ag2/PRA y microsatélites 621 y GAC2 con DNA obtenido de otros hongos patógenos y *M. tuberculosis*

El marcador SCAR₃₀₀ amplificó el DNA de *C. posadasii* (HU-1), y mostró el producto esperado de 300 pb, mientras que los DNAs obtenidos de otros hongos patógenos y *M. tuberculosis*, no evidenciaron amplificación (Figura 5). El microsatélite 621 también amplificó el DNA de *C. posadasii* (HU-1), y mostró el producto esperado de 400 pb, mientras que los DNAs obtenidos de otros hongos patógenos no mostraron amplificación (Figura 6). El microsatélite GAC2 amplificó el DNA de *C. posadasii* (HU-1), y mostró el producto esperado de 200 pb, sin embargo también amplificó varios productos de diferentes tamaños con DNA de *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *A. niger*, *S. schenkii* y de *M. tuberculosis* (Figura 6). Asimismo, el marcador Ag2/PRA amplificó el DNA de *C. posadasii* (HU-1), y reveló el producto esperado de 300 pb, no obstante, también amplificó un producto de

200-300 pb con DNA de *S. schenckii*, mientras que el resto de los hongos no mostraron amplificación (Figura 7).

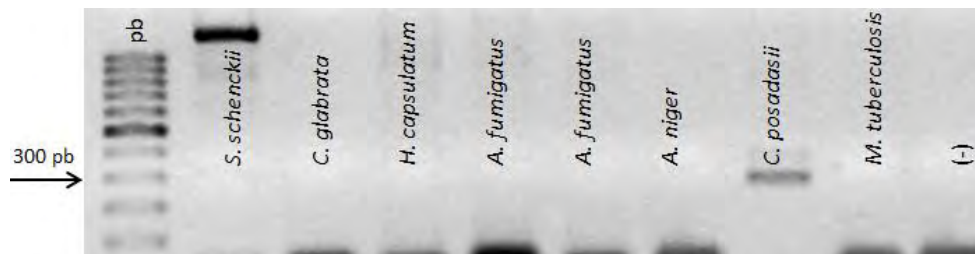


Figura 5. Especificidad del marcador SCAR₃₀₀. La determinación de la especificidad del marcador SCAR se realizó de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos, utilizando DNAs de otros hongos patógenos y de *M. tuberculosis*. Testigo negativo (-), marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

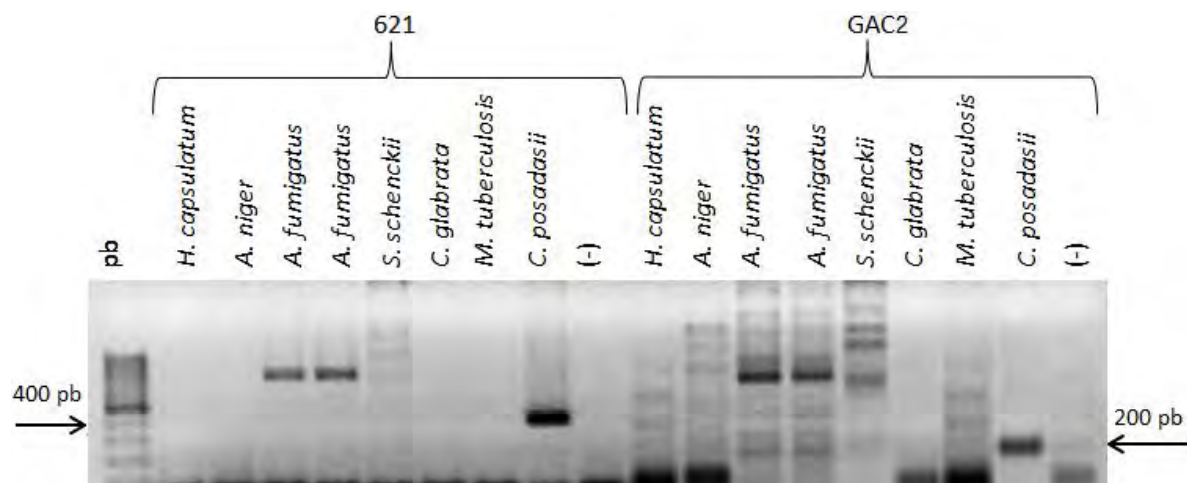


Figura 6. Especificidad de los microsatélites 621 y GAC2. La determinación de la especificidad de los microsatélites se realizó de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos, utilizando DNAs de otros hongos patógenos y de *M. tuberculosis*. Testigo negativo (-), marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

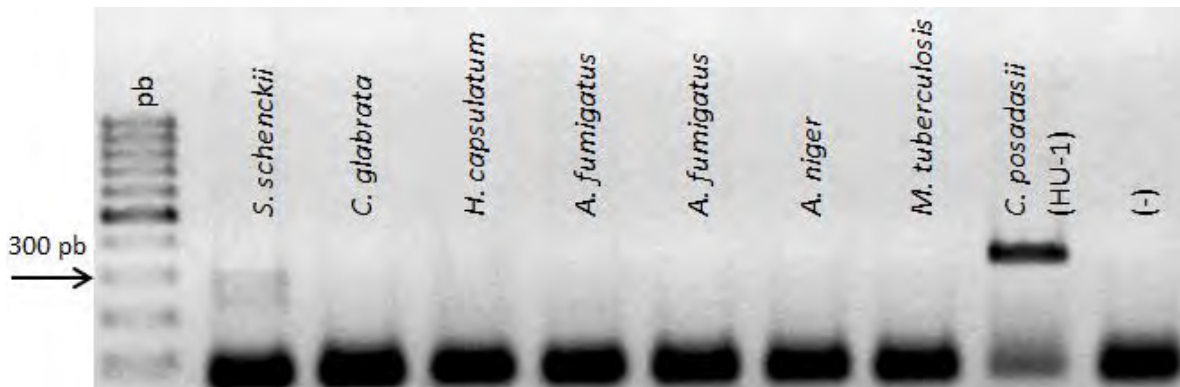


Figura 7. Especificidad del marcador *Ag2/PRA*. La determinación de la especificidad del marcador se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, utilizando DNAs de otros hongos patógenos y de *M.tuberculosis*. Testigo negativo (-), marcador de tamaño molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

Inoculación experimental en muestras biológicas (sangre y esputo) con diferentes concentraciones de DNA de un aislado de *C. posadasii* y obtención del DNA total

El DNA total obtenido de las muestras de sangre (Figura 8) y de esputo (Figura 9), inoculadas con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1 y DNA total de la muestra biológica sin inóculo como testigo negativo (-), fueron cuantificados por electroforesis en gel de agarosa. En todas las muestras probadas se obtuvo DNA total, en concentraciones que fueron entre 10-100 ng/ μ L en sangre (Figura 8) y 50-100 ng/ μ L en esputo (Figura 9).

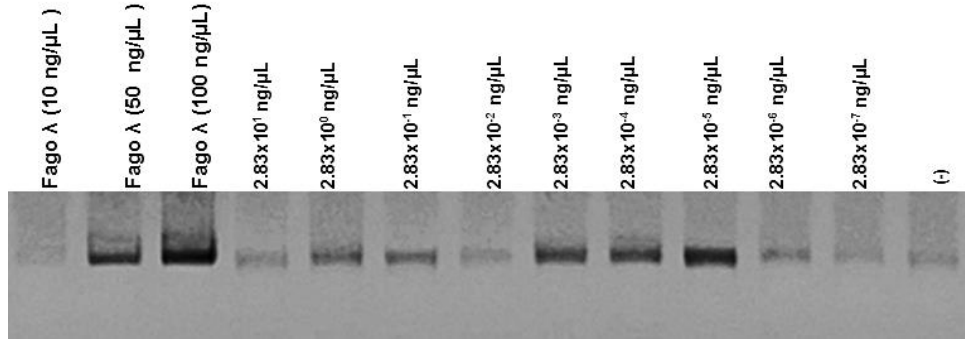


Figura 8. Electroforesis de DNA total obtenido de sangre inoculada con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1. Se utilizó DNA total de sangre sin inculo como testigo negativo (-) y diferentes concentraciones de DNA del fago lambda (GIBCO BRL®) como testigos.

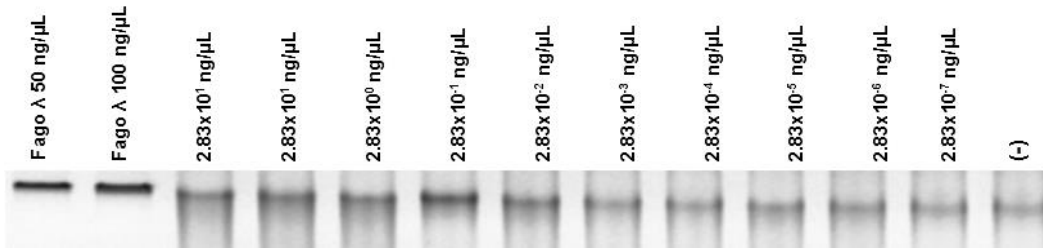


Figura 9. Electroforesis de DNA total obtenido de esputo inoculado con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1. Se utilizó DNA total de esputo sin inculo como testigo negativo (-) y diferentes concentraciones de DNA del fago lambda (GIBCO BRL®) como testigos.

Evaluación por PCR, de la sensibilidad de los marcadores SCAR₃₀₀, microsatélites GAC2 y 621, y Ag2/PRA en muestras de sangre y esputo inoculadas con DNA de *C. posadasii*

Sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀. Después de amplificar el DNA total obtenido de sangre o esputo inoculada con las diferentes concentraciones de DNA

del aislado HU-1, utilizando cuatro volúmenes diferentes (5, 10, 15 y 20 μL) de éstas para la PCR, se observaron las bandas esperadas de 300 pb desde la concentración 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-1} $\text{ng}/\mu\text{L}$ con 10, 15 y 20 μL y de 2.83×10^1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ con 5 μL en sangre (Figura 10), mientras que en la muestra de esputo usando los volúmenes de 5 y 15 μL se observaron bandas desde 2.83×10^1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ hasta 2.83×10^0 $\text{ng}/\mu\text{L}$, de igual forma con volúmenes de 10 y 20 μL se obtuvieron bandas desde 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-1} $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Figura 11).

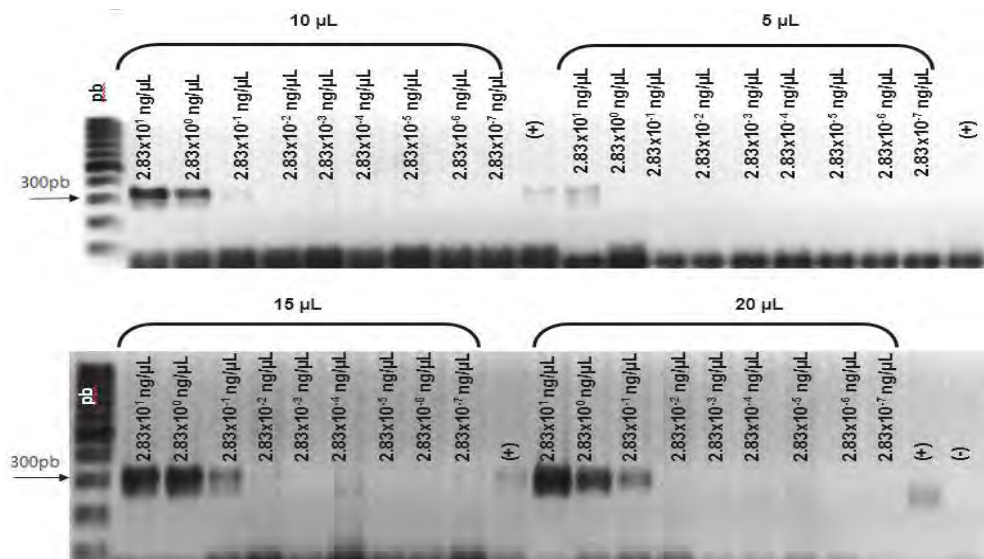


Figura 10. PCR con el marcador SCAR₃₀₀. La PCR se realizó con las muestras de DNA total obtenidas de sangre inoculada con diferentes concentraciones de DNA de *C. posadasii*. Testigo negativo: DNA de sangre total sin inóculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+).

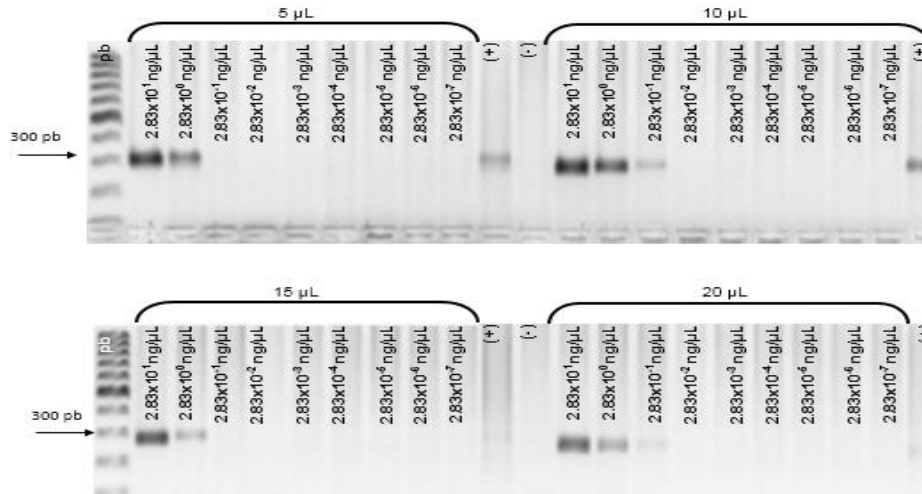


Figura 11. Sensibilidad del marcador SCAR₃₀₀. La PCR se realizó con diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 µL) de DNA total obtenido de muestras de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de DNA de *C. posadasii*, Testigo negativo: DNA total de esputo sin inóculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

Sensibilidad de los microsatélites GAC2 y 621. Después de amplificar el DNA total obtenido de sangre o esputo, inoculadas con las diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1, de cada concentración se utilizaron cuatro volúmenes diferentes (5, 10, 15 y 20 µL) para la PCR, con el microsatélite GAC2, se observaron para las muestras de sangre, bandas esperadas de 200 pb, desde la concentración 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-6} ng/µL con 5 µL, mientras que con un volumen de 10 µL de DNA total, el amplicón esperado se mostró desde las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-1} ng/µL, asimismo con un volumen de 15 y 20 µL de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-2} ng/µL (Figura 12). Para el DNA total de esputo, se obtuvo un amplicón de 200 pb, en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^0 para un volumen de 20 µL, mientras que para los volúmenes de 5, 10 y 15 µL, se

obtuvieron bandas esperadas desde la concentración de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-1} ng/ μ L (Figura 13).

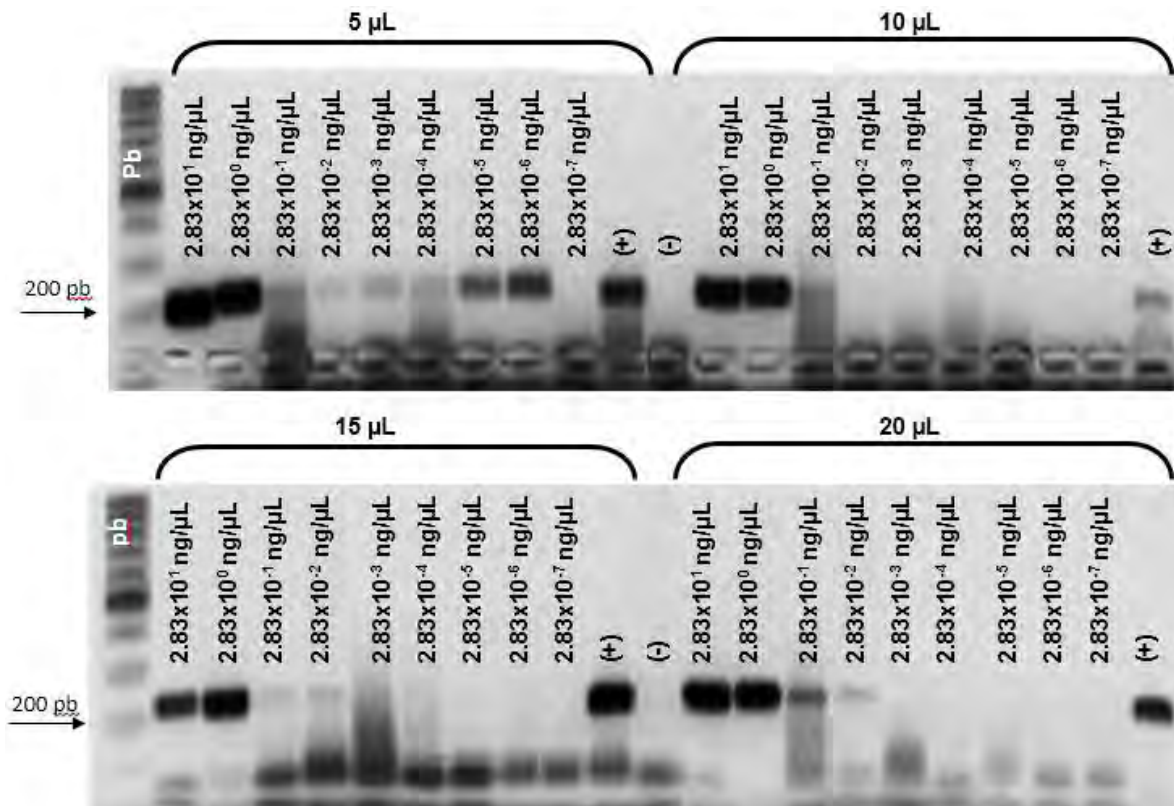


Figura 12. Sensibilidad del microsatélite GAC2, usando diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 μ L) de las muestras de DNA total obtenidas de sangre inoculada con diferentes concentraciones de DNA de *C. posadasii*. Testigo negativo: DNA de sangre total sin inóculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

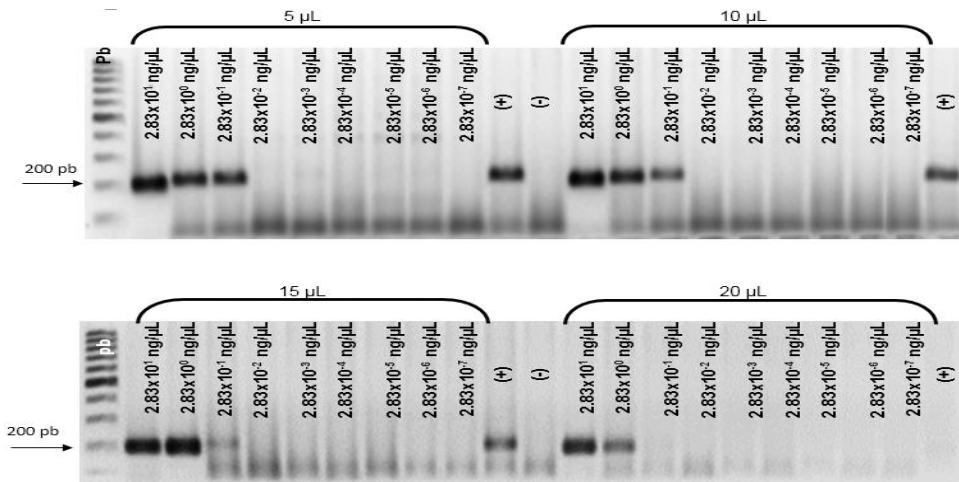


Figura 13. Sensibilidad del microsatélite GAC2, usando diferentes volúmenes de las muestras de DNA total obtenidas de esputo inoculada con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1. Testigo negativo: DNA total de esputo sin inculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

La PCR con el microsatélite 621, mostró el amplicón de 400 pb, desde la concentración 2.83×10^1 ng/ µL hasta 2.83×10^{-1} ng/µL con 5 µL de DNA total, mientras que con un volumen de 10 µL de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo desde las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-7} ng/µL, asimismo con un volumen de 15 µL de DNA total, el amplicón se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-3} ng/µL, finalmente con 20 µL de DNA total, el amplicón se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-2} ng/µL (Figura 14). La PCR con el DNA total de esputo, evidenció bandas de 400 pb, desde la concentración 2.83×10^1 ng/ µL hasta 2.83×10^{-7} ng/µL con 5 µL de DNA total, mientras que con un volumen de 10 µL de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo desde las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-6} ng/µL, asimismo con un volumen de 15 µL de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo en las

concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-3} ng/ μ L, finalmente con 20 μ L de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-2} ng/ μ L (Figura 15).

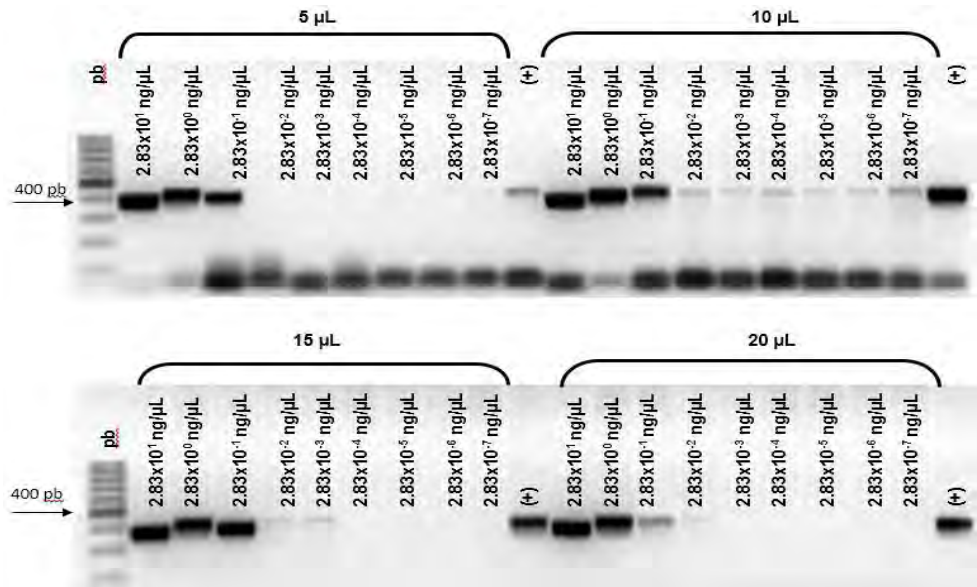


Figura 14. Sensibilidad del microsatélite 621, usando diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 μ L) de las muestras de DNA total obtenidas de sangre inoculada con diferentes concentraciones de DNA de *C. posadasii*. Testigo negativo: DNA total de sangre sin inóculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

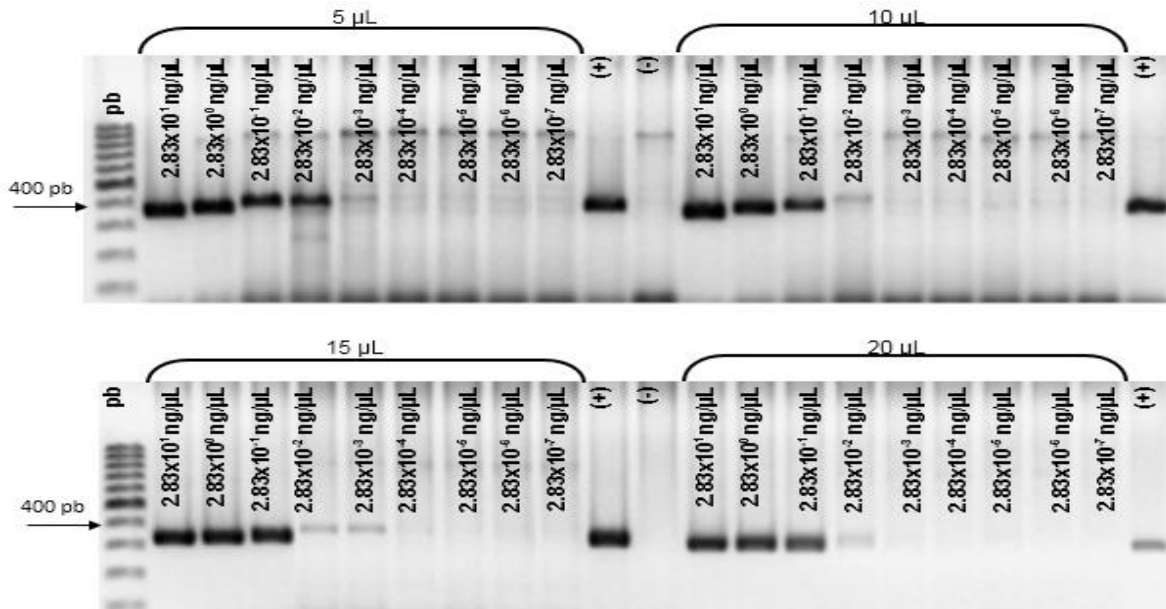


Figura 15. Sensibilidad del microsatélite 621, usando diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 µL) de las muestras de DNA total obtenidas de esputo con diferentes concentraciones de DNA de *C. posadasii* Testigo negativo: DNA total de esputo sin inóculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

Sensibilidad del marcador *Ag2/PRA*. La amplificación del DNA total, obtenido de sangre inoculada con las diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1, mostró bandas de 300 pb, desde la concentración 2.83×10^1 hasta 2.83×10^0 ng/µL con 5, 10 y 15 µL de DNA total, finalmente con 20 µL de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-1} ng/µL (Figura 16). Para el DNA total obtenido de esputo, se obtuvieron bandas de 300 pb, desde la concentración 2.83×10^1 ng/ µL hasta 2.83×10^{-5} ng/µL con 5 µL de DNA total, mientras que con un volumen de 10 µL de DNA total, el amplicón esperado se obtuvo desde las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-3} ng/µL, asimismo con un volumen de 15 µL de DNA total, el amplicón

esperado se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-7} ng/ μ L, finalmente con 20 μ L de DNA total, el amplicón se obtuvo en las concentraciones de 2.83×10^1 hasta 2.83×10^{-2} ng/ μ L (Figura 17).

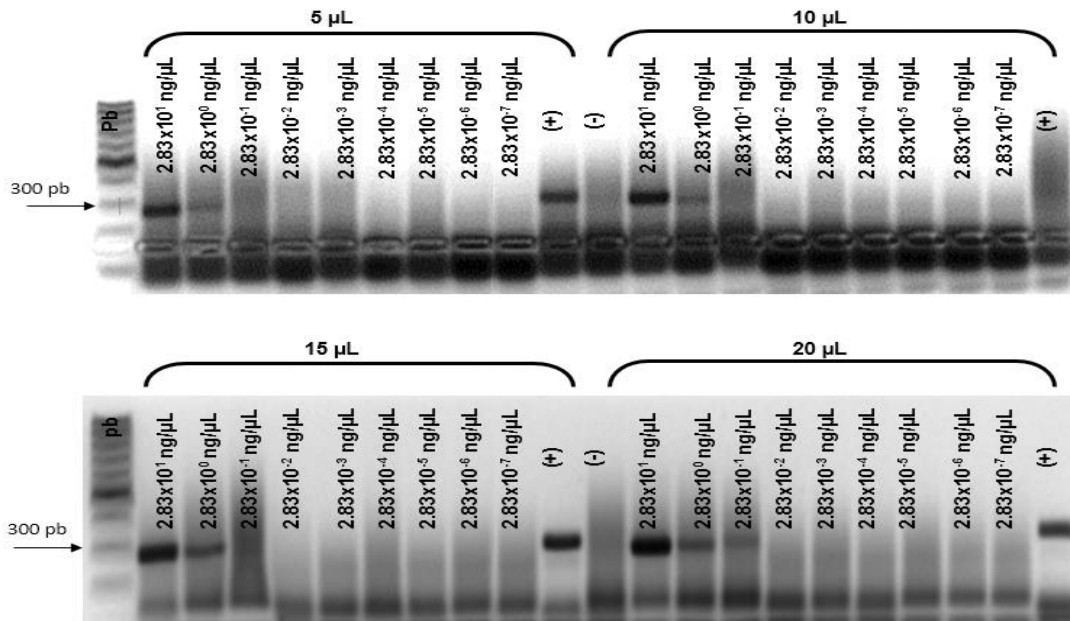


Figura 16. Sensibilidad del marcador *Ag2/PRA*, usando diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 μ L) de las muestras de DNA total obtenidas de sangre inoculada con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1. Testigo negativo: DNA total de sangre sin inóculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

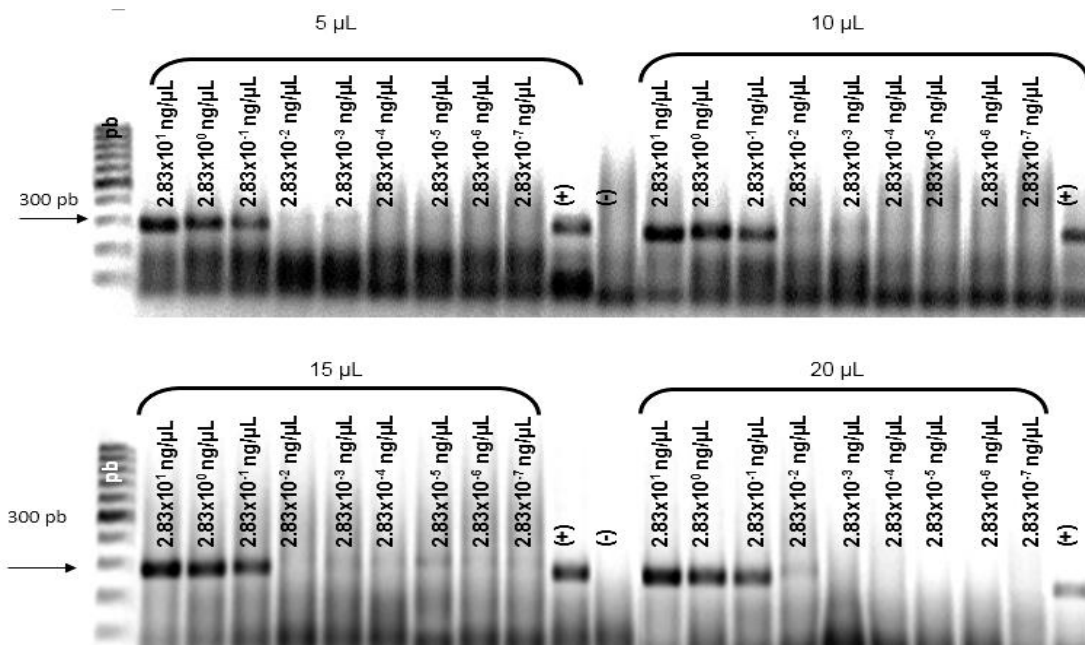


Figura 17. Sensibilidad del marcador *Ag2PRA*, usando diferentes volúmenes (5, 10, 15 y 20 μL) de las muestras de DNA total obtenidas de esputo inoculadas con diferentes concentraciones de DNA del aislado HU-1. Testigo negativo: DNA total de esputo sin inculo (-), testigo positivo: DNA del aislado *C. posadasii* (HU-1) (+)

La tabla 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos en la amplificación del DNA total de sangre y esputo inoculados experimentalmente con DNA del aislado HU-1 con los diferentes marcadores moleculares utilizados.

Tabla 3. Sensibilidad de los marcadores moleculares en muestras biológicas inoculadas experimentalmente con DNA del aislado HU-1

Volumen de la muestra	Marcador	Concentración en sangre (ng/μL)	Concentración en esputo ng/μL)
5 μL	SCAR ₃₀₀	2.83x10 ¹ ng/μL	2.83x10 ⁰ ng/μL
	621	2.83x10 ⁻¹ ng/μL	2.83x10 ⁻⁷ ng/μL
	GAC2	2.83x10 ⁻⁶ ng/μL	2.83x10 ⁻¹ ng/μL
	<i>Ag2/PRA</i>	2.83x10 ⁰ ng/μL	2.83x10 ⁻⁵ ng/μL
10 μL	SCAR ₃₀₀	2.83x10 ⁻¹ ng/μL	2.83x10 ⁻¹ ng/μL
	621	2.83x10 ⁻⁷ ng/μL	2.83x10 ⁻⁶ ng/μL
	GAC2	2.83x10 ⁻¹ ng/μL	2.83x10 ⁻¹ ng/μL
	<i>Ag2/PRA</i>	2.83x10 ⁰ ng/μL	2.83x10 ⁻³ ng/μL
15 μL	SCAR ₃₀₀	2.83x10 ⁻¹ ng/μL	2.83x10 ⁰ ng/μL
	621	2.83x10 ⁻³ ng/μL	2.83x10 ⁻⁴ ng/μL
	GAC2	2.83x10 ⁻² ng/μL	2.83x10 ⁻¹ ng/μL
	<i>Ag2/PRA</i>	2.83x10 ⁰ ng/μL	2.83x10 ⁻⁷ ng/μL
20 μL	SCAR ₃₀₀	2.83x10 ⁻¹ ng/μL	2.83x10 ⁻¹ ng/μL
	621	2.83x10 ⁻² ng/μL	2.83x10 ⁻⁴ ng/μ
	GAC2	2.83x10 ⁻² ng/μL	2.83x10 ⁰ ng/μL
	<i>Ag2/PRA</i>	2.83x10 ⁻¹ ng/μL	2.83x10 ⁻² ng/μL

DISCUSIÓN

Los métodos convencionales para establecer el diagnóstico de la coccidioidomicosis se realizan con base en varios criterios como: la detección microscópica del agente etiológico en material clínico, el crecimiento, aislamiento e identificación del hongo en cultivo y en la detección de la respuesta serológica al patógeno o un indicador de su presencia, como por ejemplo un componente celular o un producto metabólico (Duarte-Escalante *et al.*, 2014). Sin embargo, tienen ciertos inconvenientes, por ejemplo, en las primeras etapas de la enfermedad; el crecimiento del hongo es lento y su identificación en el cultivo retrasa el tratamiento, asimismo el análisis histopatológico es otra opción, pero su adecuada interpretación, depende de la experiencia del observador y de la técnica histoquímica apropiada (Muñoz-Hernández *et al.*, 2008).

Aunque en los últimos años, se han desarrollado nuevos procedimientos diagnósticos que utilizan métodos moleculares para la detección de DNA fúngico en material clínico (Fisher *et al.*, 2002; Bialek *et al.*, 2004; Umeyama *et al.*, 2006; Tintelnot *et al.*, 2007), algunos con mayor o menor especificidad y sensibilidad, estas técnicas no han sido estandarizadas para su utilización rutinaria en los laboratorios clínicos, por lo que la estandarización y validación del marcador molecular SCAR₃₀₀ (Duarte-Escalante, 2014), empleado en el presente trabajo, con muestras biológicas, es una aportación importante como herramienta diagnóstica para esta enfermedad en nuestro país.

Por otro lado, los marcadores SCAR han confirmado ser muy útiles, ya que técnicamente, el desarrollo de un marcador SCAR requiere el uso de dos iniciadores específicos, diseñados a partir de secuencias de nucleótidos,

obtenidos de fragmentos generados por técnicas como el RAPD o AFLP, clonado y ligado a un rasgo de interés. Una vez que se desarrolla, se puede aplicar a un gran número de muestras, las cuales pueden ser examinadas al mismo tiempo, por lo tanto, reduce el tiempo y aumenta la fiabilidad (Bhagyawant *et al.*, 2016).

Además, sus secuencias han sido utilizadas en la construcción de bibliotecas genómicas, en el control biológico, a través del control de cepas de hongos en el medio ambiente y en programas de mejoramiento genético, asimismo los marcadores SCAR pueden discriminar una amplificación de DNA específico en una muestra que contenga una mezcla de hongos (Frías-De-León *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que el desarrollo de marcadores moleculares a partir de aislados autóctonos, como es el caso del marcador SCAR₃₀₀, cobra gran relevancia debido a que se ha comprobado una gran variabilidad genética en aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* de diferente origen geográfico (Jewel *et al.*, 2008; Duarte-Escalante *et al.*, 2013), por lo que se ha sugerido que los marcadores moleculares que se utilicen para la detección de patógenos a partir de muestras clínicas, deben diseñarse a partir de aislamientos autóctonos en la región en la que se van a utilizar, de ahí la importancia de la validación de este marcador SCAR₃₀₀ para ser utilizado en nuestro país.

Los resultados del presente trabajo, mostraron que el marcador SCAR₃₀₀, fue eficiente para amplificar el DNA de *Coccidioides*, a partir de muestras biológicas (sangre y esputo) inoculadas experimentalmente con diferentes diluciones de DNA del aislado HU-1, sin embargo evidenció una menor sensibilidad que los microsatélites GAC2 y 621 (Fisher *et al.*, 2002). También se mostró que el marcador SCAR₃₀₀, tuvo una sensibilidad muy parecida al marcador *Ag2/PRA*, por

lo que se confirma su utilidad como herramienta diagnóstica para la coccidioidomicosis.

En cuanto a la especificidad del marcador SCAR₃₀₀, éste mostró ser tan específico como el microsatélite 621, ya que ambos sólo amplificaron el DNA de *C. posadasii*, mientras que el microsatélite GAC2 amplificó además del DNA de *C. posadasii*, el DNA de *A. fumigatus*, *A. niger*, *H. capsulatum*, *S. schenckii*, y *M. tuberculosis*; el marcador *Ag2/PRA*, también amplificó además del DNA de *C. posadasii*, el DNA de *S. Schenckii*, lo que los hace menos eficientes para ser utilizados en la práctica diagnóstica de la coccidioidomicosis.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, relacionados con la utilización de diferentes volúmenes del DNA total (muestra biológica inoculada con DNA del aislado HU-1), se recomienda que para la PCR con el marcador SCAR₃₀₀ se utilice un volumen de 10 y 15 µL del DNA total obtenido de sangre y esputo, lo cual constituye una guía para el personal de laboratorio encargado de realizar el diagnóstico molecular, ya que estos resultados le pueden orientar hacia la cantidad mínima necesaria de DNA total de su muestra, para realizar la PCR y lograr un resultado positivo.

A pesar que el microsatélite 621 mostró una mayor sensibilidad que el marcador SCAR₃₀₀, es pertinente mencionar que nuestro marcador tiene la ventaja de haber sido obtenido de aislados de México, mientras que los microsatélites 621 y GAC2, así como el marcador *Ag2/PRA*, fueron obtenidos de aislados de EUA, corriendo el riesgo de que éstos no reconozcan aislados de México.

Sin embargo, es fundamental que el marcador SCAR₃₀₀, probado en este trabajo con muestras biológicas inoculadas experimentalmente con DNA de un aislado de

C. posadasii (HU-1), sea probado con el mayor número de muestras clínicas posibles, en pacientes con sospecha de coccidioidomicosis para corroborar su utilidad diagnóstica.

CONCLUSIONES

El marcador SCAR₃₀₀ demostró ser sensible y específico para la identificación de *Coccidioides* spp. en muestras de sangre y esputo.

Para la PCR con el marcador SCAR₃₀₀, se recomienda un volumen de 10 y 15 µL del DNA total obtenido de sangre y esputo.

El marcador SCAR₃₀₀, evidenció una eficiencia aceptable comparada con el microsatélite 621 (Fisher *et al.*, 2002).

El marcador SCAR₃₀₀, presentó una mejor especificidad que el microsatélite GAC2 Fisher *et al.* (2002) y el marcador *Ag2PRA* (Bialek *et al.*, 2004).

REFERENCIAS

1. Abbasi P, Miller S, Meulia T, Hoiting H, Kim J. Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes using molecular markers. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:5421-5426.
2. Ampel NM. The treatment of coccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:51-56.
3. Assi MA, Binnicker MJ, Wengenack NL, Deziel PJ, Badley AD. Disseminated coccidioidomycosis in a liver transplant recipient with negative serology: use of polymerase chain reaction. *Liver Transpl.* 2006;12:1290–2
4. Baptista R, Riquelme M. Epidemiología de la coccidioidomycosis en México. *Rev Ibero Mico.* 2007;24:100-106.
5. Bhagyawant SS. RAPD-SCAR markers: An interface tool for authentication of traits. *J Biosci Med.* 2016;4:1-9.
6. Bialek R, Kern J, Herrmann T, Tijerina R, Cecenas L, Reischl U, González GM. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol.* 2004;42:778–783.
7. Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfel SL, Wengenack NL. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2007;45:173–178.
8. Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G, Iachini R. Agentes de micosis endémicas en un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros. *Rev Iberoam Micol.* 2010;27:14–19.

9. 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. La coccidioidomicosis en Argentina, 1892-2009. *Rev Arg Microbiol.* 2010a;42:261-268.
10. Cordeiro RA, Brilhante RSN, Rocha MFG, Bandeira SP, Fachine MAB, Camargo ZP, Sidrim JJC. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66:65-72.
11. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses.* 2015;58:34–44.
12. Chiller TM, Galgiani JN, Stevens DA. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17:41-57.
13. De Macedo RCL, Rosado AS, Da Mota FF, As Cavalcante M, D EulálioK, D Filho A, Ms Martins L, Lazéra MS, Wanke B. Molecular Identification Of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiol.* 2011;11: 108.
14. Duarte-Escalante E, Frías-De-León MG, Zúñiga G, Martínez HE, Acosta-Altamirano G. Molecular markers in the epidemiology and diagnosis of coccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31:49–53.
15. Duarte-Escalante E, Zúñiga G, Frías-De-León MG, Canteros C, Castañón-Olivares LR, Reyes-Montes MR. AFLP analysis reveals high genetic diversity but low population structure in *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina. *BMC Infect Dis* 2013;13:411.

16. Duarte-Escalante E. Estructura de poblaciones de aislados de *Coccidioides* spp. procedentes de México y Argentina y obtención de marcadores SCARs para su identificación [Tesis doctoral]. México: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
17. Egeberg RO, Elconin AE, Egeberg MC. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *J Bacteriol.* 1964;88:473-476.
18. Elconin AF, Egeberg RO, Egeberg MC. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol.* 1964;87(3):500–503.
19. Fisher FS, Bultman MW, Johnson SM, Pappagianis D, Zaborsky E. *Coccidioides* niches and habitat in the Southwestern United States: a matter of scale. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1111:47-72.
20. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov. previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia.* 2002;94:73-84.
21. Frías-De-León MG, Arenas López G, Taylor ML, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MR. Development of specific SCAR markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 2012;50:673-679.
22. Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor JW. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia.* 2000;92:406-410.
23. Hector RF, Laniado-Laborin R. Coccidioidomycosis—A fungal disease of the Americas. *PLoS Med.* 2005;2(1):e2.

24. Hector RF, Rutherford GW, Tsang CA, Erhart LM, McCotter O, Anderson SM, Komatsu K, Tabnak F, Vugia DJ, Yang Y, Galgiani JN. The public health impact of coccidioidomycosis in Arizona and California. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8:1150-1173.
25. Hung CY, Yu JJ, Lehmann PF, Cole GT. Cloning and expression of the gene which encodes a tube precipitin antigen and wall associated beta-glucosidase of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun*. 2001;69:2211–2222.
26. Jewell K, Cheshier R, Cage GD. Genetic diversity among clinical *Coccidioides* spp. isolates in Arizona. *Med Mycology*. 2008;46:449-455.
27. Johnson SM, Zimmermann CR, Pappagianis D. Amino-Terminal Sequence Analysis of the *Coccidioides immitis* Chitinase/Immunodiffusion-Complement Fixation Protein. *Infect Immun*. 1993;61(7):3090-2.
28. Johnson L, Gaab ME, Sanchez J, Bui QP, Nobile JC, Hoyer KK, Peterson WM, Ojcius MD. Valley Fever: Danger lurking in a dust cloud. *Microbes Infect*. 2014;16:591–600.
29. Kolivras, KN, Johnson PS, Comrie AC, Yool SR. Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever). *Aerobiologia*. 2001;17:31-42.
30. Laniado-Laborín R. Coccidioidomycosis and other endemic mycosis in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2007;24:249-258.
31. Laniado-Laborín R. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the western hemisphere. *Ann NY Acad Sci*. 2007a;1111:19–34.
32. Lewis GRE, Bowers RJ, Barker MB. Dust devil: The life and times of the fungus that causes valley fever. *PLoS Pathog*. 2015;11:1004762.

33. Li K, Rouse D, Eyestone E, German T. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. *Mycol Res*. 1999;11:1361-1368.
34. Linde M, Mattiesch L, Debener T. Rpp1, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and confirmation of disease resistance data. *Theor Appl Genet*. 2004;109:1261-1266.
35. Luo R, Greenberg A, Stone DC. Hospitalized burden and outcomes of coccidioidomycosis: A nationwide analysis, 2005–2012. *Med Mycol*. 2016;00:1–7.
36. Matuk-Pérez y, Rodríguez-Leyva I, Torres-Corzo J, Oros-Ovalle C, De La Rosa-Quiroz CE. Coccidioidomycosis meníngea: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Rev Mex Neuroci*. 2014;15:224-228.
37. Millar BC, Jiru X, Walker MJ, Evans JP, Moore JE. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? *J Clin Microbiol*. 2003;41:5778-5780.
38. Mondragón-González R, Méndez TLJ, Bernal VE, Hernández HF, López MR, Manzano GP, Ríos RC, Contreras PC, Anides FAE. Detección de infección por *Coccidioides immitis* en zonas del estado de Coahuila, México. *Rev Arg Microbiol*. 2005;37:135-138.
39. Muñoz HB, Martínez RMA, Palma CG, Tapia DA, Manjarrez ZME. Mycelial forms of *Coccidioides* spp. in the parasitic phase associated to pulmonary coccidioidomycosis with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:813-820.

40. Negroni R, Arechavala A, Maiolo E. Coccidioidomycosis. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2010;38:179-188.
41. Nguyen C, Barker BM, Hoover S, Nix DE, Ampel NM, Frelinger JA, Marc J, Orbach MJ, Galgiani JN. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):505–525.
42. Pan S, Cole TG. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. *Infect Immun.* 1995;63:3994–4002.
43. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive sequence based PCR. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2977–2982.
44. Reyes-Montes MR, Pérez-Huitrón MA, Ocaña-Monroy JL, Frías-De-León MG, Martínez-Herrera E, Arenas R, Duarte-Escalante E. The habitat of *Coccidioides* spp. and the role of animals as reservoirs and disseminators in nature. *BMC Infect Dis.* 2016;16:550.
45. Saubolle AM, McKellar PP, Sussland D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:26–30.
46. Stockamp WN, Thompson RG III. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin N Am.* 2016;30:229–246.
47. Tintelnot K, De Hoog GS, Antweiler E, Losert H, Seibold M, Brandt MA, Gerrits Van Den Ende AHG, Fisher MC. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol.* 2007;45:385–393.

48. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. 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.* 2006;44:1859-1862.
49. Weber J, Díez J, Selosse M, Tagu D, Le Tacon F. SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. *Mycorrhiza.* 2002;12:19-27.
50. Welsh O, Vera-Cabrera L, Rendon A, González G, Bonifaz A. Coccidioidomycosis. *Clin Dermatol.* 2012;30:573–591.
51. Wilken AJ, Sondermeyer G, Shusterman D, McNary J, Vugia JD, McDowell A, Borenstein P, Gilliss D, t Ancock B, Prudhomme J, Gold D, Windham GC, Lee L, Materna BL. Coccidioidomycosis among workers constructing solar power farms, California, USA, 2011–2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1997-2005.
52. Xu M, Huaracha E, Korban S. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. *Genome.* 2001;44:63-70.
53. Xu M, Korban S. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the Vf locus in apple genome. *Plant Mol Biol.* 2002;50:803-818.