



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estandarización de PCR anidada para la
identificación de DNA de *Coccidioides* spp. en
muestras de suelo**

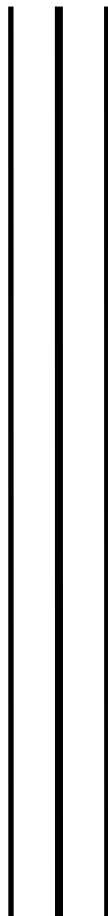
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GABRIELA MORALES FLORES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES**

Cd. Universitaria, Ciudad de México 2016



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.

1. Datos del a alumno
Morales
Flores
Gabriela
59155099
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308103159
2. Datos del tutor
Dra.
Laura Rosio
Castañón
Olivares
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Francisca
Hernández
Hernández
4. Datos del sinodal 2
Dr
Juan Luis
Chávez
Pacheco
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María del Pilar
Cabrales
Romero
6. Datos del sinodal 4
Biol.
Elva
Bazán
Mora
7. Datos del trabajo escrito
Estandarización de PCR anidada para la identificación de DNA de
Coccidioides spp. en muestras de suelo
56 p
2016

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis abuelos Rita y José

A mi madre Lourdes y mis hermanas Guadalupe y Carolina

A mi Mérida

“ El ADN opera de maneras misteriosas”

Richard Dawkins

“Le debo a Ezequiel el haberme enseñado que la vida
no es más que eso: Asomar la cabeza, para ver
qué pasa afuera, aunque haya tormenta...”

Antonio Santa Ama

Agradecimientos

Agradezco enormemente a mi tutora de tesis, la Dra. Laura Rosio Castañón Olivares por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este proyecto; permitiéndome equivocarme, aprender y seguir creciendo como estudiante y profesional. Recordaré su naturalidad enérgica, su comprensión, su innovación y su llaneza.

A mis sinodales por aceptar ser parte de mi jurado; por su tiempo para la revisión de este trabajo y por sus correcciones y comentarios: a la Dra. Francisca Hernández Hernández, al Dr. Juan Luis Chávez Pacheco, a la Biol. Elva Bazán Mora y en especial a la Dra. María del Pilar Cabrales Romero que aparte de sus observaciones en este trabajo, fue una buena profesora, persona y me ha demostrado su apoyo en lo profesional y personal.

A la Q.F.B Erika Córdova Martínez por su disposición, amabilidad al resolverme las dudas que tenía durante la parte técnica de microbiología y biología molecular; y por transmitirme su entusiasmo y alegría en el laboratorio.

Al Dr. Gabriel Sandoval por su colaboración y explicaciones en la parte de biología molecular. Su aportación fue de gran ayuda para concluir este trabajo.

A los profesores del Taller de Biología de hongos de importancia médica: al Dr. Rubén López Martínez y a la M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM, por la beca otorgada como estudiante de licenciatura, incluida durante el financiamiento a través del proyecto PAPIME PE202414.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas hace ocho años y en especial al CCH Oriente y a la Facultad de Ciencias por permitirme aprender y ser una mejor persona de razonamiento.

Agradecimientos

A mi familia, que me ha estado apoyando en cada paso que he dado. A mi abuelita Rita, que no pudo verme terminar este paso importante en mi vida, pero que siempre estará presente en mis pensamientos. Agradezco, a mi madre que me ha soportado todos estos años, que me ha acompañado, apoyado y no me ha puesto barreras para hacer lo que deseo. A mis hermanas rebeldes, Carolina y Guadalupe. A mi primo Rodrigo y a mi prima Karla. A mi tía Lidia que me ha enseñado que no hay límites, no hay excusas y que todo se puede; es un gran ejemplo y a mi tío Juan que me impuso la lectura y la música.

A la candidata a Doctora en Ciencias Carolina Brunner, por su amistad, apoyo, comentarios y me haya compartido el interés a la investigación científica. Asimismo, a mis amigos del CCH Oriente y a mis amigas de la Facultad de Ciencias: Marian Pérez C., Yecenia Martínez, Ivonne Osnaya, Isabel Rangel y a una persona que me ha enseñado que la vida es mas allá de lo inesperado; que durante el humor, en el baile, en las enfermedades, en la tristeza y en los triunfos siempre ha estado presente, a Sandra B. Villegas García.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	9
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	
Clasificación taxonómica y filogenia	13
Distribución biogeográfica	14
Morfología y ciclo de vida	14
Ecología	16
Coccidiodomicosis	18
Reacción en cadena de la polimerasa	19
Complejo del gen DNA ribosomal y la región especiadora transcrita	20
ANTECEDENTES	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
OBJETIVOS	
General	26
Específicos	26
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	
Bioseguridad	29
Estandarización de PCR anidada con la cepa control	29

Diseño de oligonucleótidos	29
Oligonucleótidos internos	29
Oligonucleótidos externos	30
Microorganismos	31
Extracción de DNA de cultivos de hongos	31
Calidad y cantidad de DNA recuperado	32
Curvas de cloruro de magnesio y temperatura	34
Condiciones de amplificación	35
Electroforesis	35
Prueba de sensibilidad	35
Secuenciación de la cepa Ci02	36
Estandarización de PCR anidada con suelo inoculado con artroconidios	36
Suelos naturales para inoculación de artroconidios	36
Conteo de artroconidios	36
Inoculación de suelo con artroconidios de <i>Coccidioides immitis</i>	37
Extracción de DNA de muestras de suelo	37
Curvas de cloruro de magnesio y temperatura	38
Prueba de sensibilidad	38
Secuenciación del suelo inoculado con artroconidios	38
PCR anidada de muestras de suelo de zonas endémicas	39
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN	50
LITERATURA CITADA	51

RESUMEN

C. posadasii y *C. immitis*, son los hongos causantes de la coccidioidomicosis, infección que afecta a mamíferos y obtenida mediante la inhalación de la fase infectante del hongo a partir del suelo. En México, los casos humanos de coccidioidomicosis se distribuyen principalmente en los estados del norte.

La recuperación de *Coccidioides* spp. a partir del suelo se ha llevado a cabo con el aislamiento en medios de cultivo *in vitro* e inoculación en animales de laboratorio y mediante la detección de su DNA amplificado con PCR. Todas esas técnicas han mostrado diferentes porcentajes de eficiencia en la identificación del organismo a partir de suelo.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar una técnica de PCR anidada (PCR-n) sensible y confiable para la detección de DNA de *Coccidioides* spp. a partir de muestras de suelo.

Empleando secuencias depositadas en GenBank, se diseñaron oligonucleótidos a partir de una región conservada y otra variable (genes 18S, 5.8S y 28S DNA ribosomal e ITS 1 y ITS2) del genoma de *Coccidioides* spp. Se hizo la extracción del DNA de cultivos de *Coccidioides immitis* y de otros hongos ascomicetos cercanos a él y se procedió a la estandarización de la PCR-n, con los oligonucleótidos propuestos y con énfasis en la concentración de MgCl y temperaturas de alineamiento (curvas de calibración). Simultáneamente se realizó la inoculación de suelos con artroconidios de *Coccidioides immitis*, los cuales se incubaron durante 14 días a 26-28°C para posteriormente extraer el DNA y amplificarlo con las condiciones probadas en el ensayo anterior. Una vez establecidas las condiciones de amplificación, se realizó una curva de sensibilidad a partir de diluciones efectuadas del DNA de *C. immitis* y de aquel obtenido en los suelos inoculados. La técnica de PCR-n diseñada se probó en suelos de zonas de Morelia, México y de Baskerfield, Cal, EUA, lugares considerados endémicos de coccidioidomicosis

Esta técnica permitió amplificar e identificar DNA de *Coccidioides* spp. de suelo inoculado y de cultivos puros. No hubo reacción cruzada con otros ascomicetos. El

límite de detección de DNA a partir de un cultivo de *C. immitis* fue de 100 pg/ μ L y a partir del suelo inoculado con arthroconidios fue de 1 ng/ μ L de DNA metagenómico. Las muestras de suelo provenientes de zonas endémicas de la enfermedad, fueron negativas.

Por la sensibilidad y especificidad mostrada, se recomienda la técnica diseñada para uso en la identificación de *Coccidioides* spp. a partir de sustratos naturales que puedan fungir como reservorios o vectores del hongo.

ABREVIATURAS

Blast	Basic Local Alignment Search Tool
Ci02	<i>Coccidioides immitis</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EUA	Estados Unidos de América
fg	femtogramo
g	gramo
HMG	High movility group (Grupo conservado de alta movilidad)
IDT	Integrated DNA Technologies
ITS	Internal transcribed spacer (Región espaciadora transcrita)
KOH	Hidroxido de Potasio
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
µL	microlitro
mM	milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramos
NTC	Not template control (sin templado)
pb	Pares de bases
pg	picogramos
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-n	Nested polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa anidada)
PFE	Primer forward externo (Iniciador hacia adelante externo)
PFI	Primer forward interno (Iniciador hacia adelante interno)

PM	Marcador de peso molecular
PRE	Primer reverse externo (Iniciador hacia atrás externo)
PRI	Primer reverse interno (Iniciador hacia atrás interno)
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico ribosomal)
RNAsa	Ribonucleasa
SJZ	San José de la Zorra, Baja California, México
S+NaCl	Agar dextrosa Sabouraud con cloruro de sodio
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato-etildiaminotetraacético
TGen	Translational Genomics Research Institute (Instituto de Investigación Genómica Transnacional)
Tm	Temperatura de melting (alineamiento)
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Luz ultravioleta
VDP	Valle de las Palmas, Baja California, México

INTRODUCCIÓN

Clasificación taxonómica y filogenia

El género fúngico *Coccidioides*, tiene dos especies *C. immitis* y *C. posadasii*, ambas son especies indistinguibles morfológicamente [1]. Su clasificación es la siguiente:

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Onygenales
Familia	Onygenaceae
Género	<i>Coccidioides</i>
Especies	<i>C. immitis</i> y <i>C. posadasii</i>

Por análisis molecular, bioquímico, inmunológico, filogenético (Familia: Onygenaceae) y morfológico, su pariente más cercano es *Uncinocarpus reesii*, fase sexual del hongo anamorfo *Malbranchea* sp. [2], [3].

El análisis del linaje ancestral de *Coccidioides* spp, ha demostrado que la selección positiva puede haber contribuido a la adaptación del organismo dentro de un hospedero mamífero inmunocompetente, conclusión obtenida mediante la comparación de su genoma con sus parientes filogenéticos [3]. *Coccidioides* spp. presentan tres genes adicionales *Mep* de la familia Deuterolisina (*M35*) [4] le han permitido la adaptación al parasitismo. La cronología de la evolución de *Coccidioides* spp., muestra altas posibilidades de que haya divergido de *U. reesii* y adquirido recientemente, el genotipo patógeno [3].

Distribución biogeográfica

Coccidioides spp. es un hongo endémico en algunos suelos de Estados Unidos de América (EUA) como Arizona, California, Nevada, Nuevo México, Texas, Utah [5] y Washington [6]. En México, debido a que en los estados del norte de la república es de donde se reporta la mayor parte de casos humanos de coccidioidomicosis, se supone que el hábitat del hongo se encuentra en suelos de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango y San Luis Potosí (Figura 1) [7]. En algunos países del Centro y Sur de América [5] también se han registrado casos de esta enfermedad, pero no hay registro del hallazgo del hongo en la naturaleza.

C. posadasii tiene mayor extensión en su distribución geográfica que *C. immitis* [5], pero pueden co-existir en las mismas regiones endémicas. Ambas especies comparten zonas de Utah (EUA) [8], del sur de California (EUA), México (llamadas zonas simpátricas) [1].

Morfología y ciclo de vida

Las especies anamórficas, del género *Coccidioides*, son hongos dimórficos que crecen en el ambiente en fase filamentosa formada por hifas tipo septadas. En cada hifa, se forman las esporas (artroconidios) se diferencian del resto de la hifa y se separan de otros segmentos que se autolisan. Este proceso produce células en forma de barril que son aproximadamente 3 a 5 μm de tamaño y son los propágulos de infección para los mamíferos [9]. Bajo condiciones secas, los artroconidios son esporas muy estables, que mantienen su viabilidad por muchos años. Cuando son inhalados hacia el inferior de de los pulmones (a nivel del bronquiolo terminal), el hongo crece isotrópicamente, remodelando su pared celular y formando la esférula, estructura parasitaria patognomónica de *Coccidioides* [3]

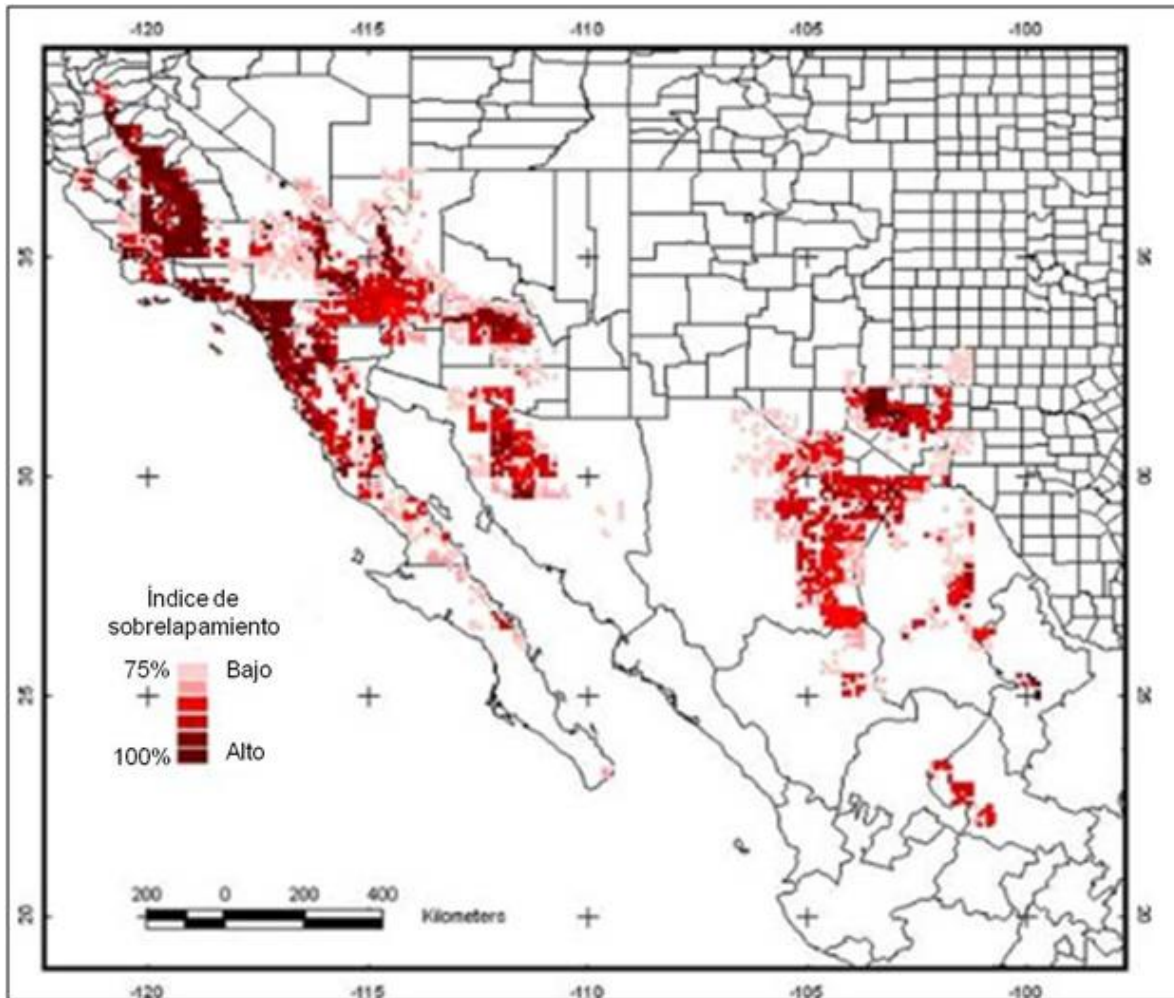


Figura 1. Modelación del nicho ecológico de *Coccidioides* spp. en el Noreste de América basado en datos ambientales, climáticos y topográficos [7].

La esférula se expande en tamaño, sufre diversas divisiones nucleares. La esférula madura es de 30 – 80 μm de diámetro y puede contener 200 – 400 y hasta 800 estructuras asexuales llamadas endosporas [10]. Cuando las esférulas están completamente maduras, se rompen y las endosporas son liberadas, cada una de ellas con la capacidad de desarrollar una nueva esférula [11] (Figura 2).

Aunque la forma sexual de *Coccidioides* spp. no es conocida, los *loci* tipo MAT identificados son típicos de un ascomiceto heterotálico con idiomorfos en un único *locus*. En la secuencia del genoma de *C. immitis* y *C. posadasii* se identificó un

idiomorfo que contiene la caja HMG (grupo conservado de alta movilidad) de un locus de tipo *MAT1-2* y otro que contiene un gene α -box que define el *locus MAT1-1* [12].

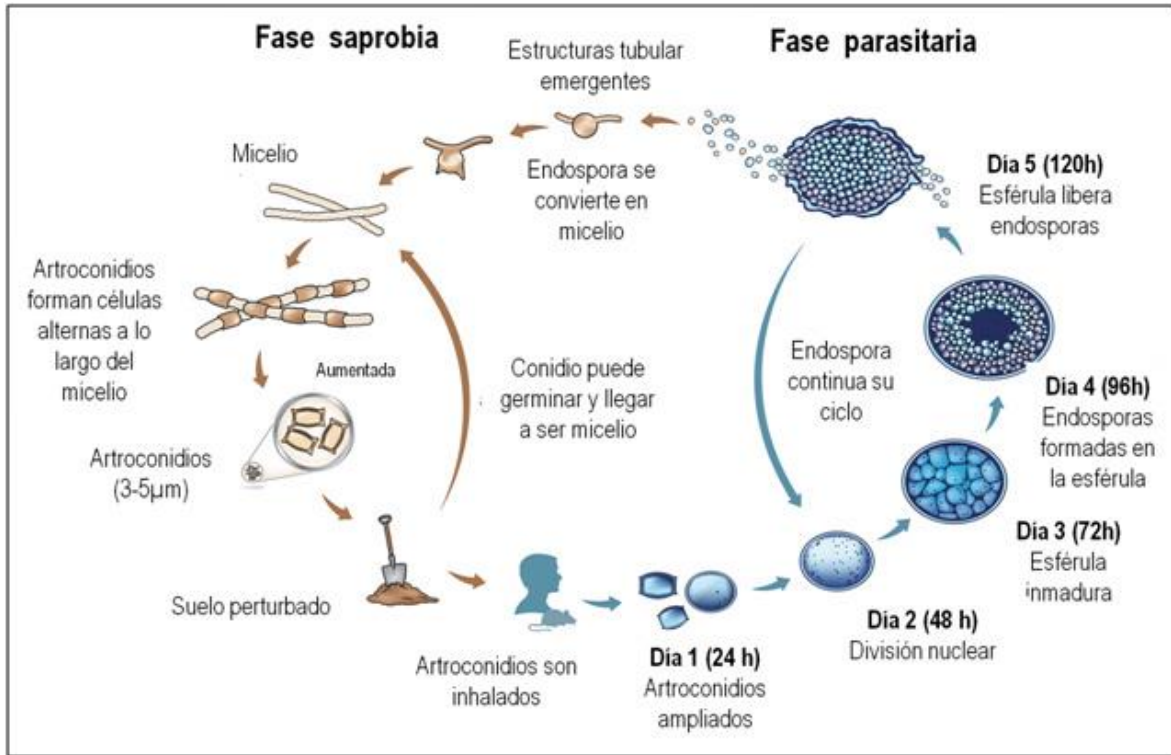


Figura 2. Ciclo de vida anamórfico del género *Coccidioides* spp. La fase parasitaria o esférula sucede en el huésped y la fase infectante se desarrolla y acumula en el suelo [9], [11].

Ecología

El aislamiento de *Coccidioides* spp a partir del suelo. ha sido difícil pero en este ambiente puede crecer, desarrollarse y acumularse. El sitio de crecimiento se define como aquellas zonas en donde las condiciones físicas, químicas y biológicas son adecuadas para la terminación del ciclo de crecimiento requerido por el organismo, mientras que un sitio de acumulación es el lugar donde los artroconidios (esporas) de *Coccidioides* spp. pueden estar depositados sobre o

cerca de la superficie del suelo después de la transportación del sitio de crecimiento por viento, agua, organismos o actividades antropogénicas [5].

Los factores que influyen en el crecimiento de *Coccidioides* spp. en el suelo, incluyen la: disponibilidad de humedad, temperatura, textura, alcalinidad, salinidad (Cuadro 1), contenido orgánico, grado de exposición a la luz solar, luz UV y a la competencia con otros organismos [5].

Coccidioides spp. son competidores eficientes en medios con alto contenido de cloruro de sodio con respecto a otros organismos [13]. El crecimiento de *C. posadasii* es más lento que el de *C. immitis* en presencia de 0.136 M de cloruro de sodio y en presencia de altas temperaturas (40°C) [1].

Cuadro 1. Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento de *Coccidioides* [5].

Factores		Rangos
Agua	Precipitación anual	5 cm y 50 cm
	Humedad relativa	56 y 90%
Temperatura		>55°C: letal en corto tiempo 40-55°C: límite en temperatura alta 20-40°C: crecimiento óptimo 5-20°C: crecimiento marginal 0-5°C: en su mayoría en estado latente pero los artroconidios pueden estar viables <0°C: latente pero viables y capaces de crecer.
pH		6.1 a 8 (no es un factor limitante)
Salinidad		126 a 1910 mg/L
Conductividad eléctrica		251 a 3900 µS/cm

Coccidioidomicosis

Es el nombre de la infección causada por los agentes etiológicos *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*. La micosis es conocida también como “fiebre del Valle de San Joaquín” o “reumatismo del desierto”.

Inicialmente la enfermedad es una infección que se adquiere por vía respiratoria, que se manifiesta en un amplio rango de signos y síntomas, desde una enfermedad asintomática en aproximadamente el 60% de los casos, hasta bronquitis aguda o neumonía en alrededor del 40% de las infecciones [14].

Ocasionalmente la diseminación extrapulmonar se presenta (0.5 a 2% de las personas infectadas) resultando en una tasa de fatalidad de aproximadamente 50% de los casos (Figura 3), por lo cual la enfermedad además del impacto en salud pública, cobra importancia en el ámbito económico de las áreas endémicas [14].

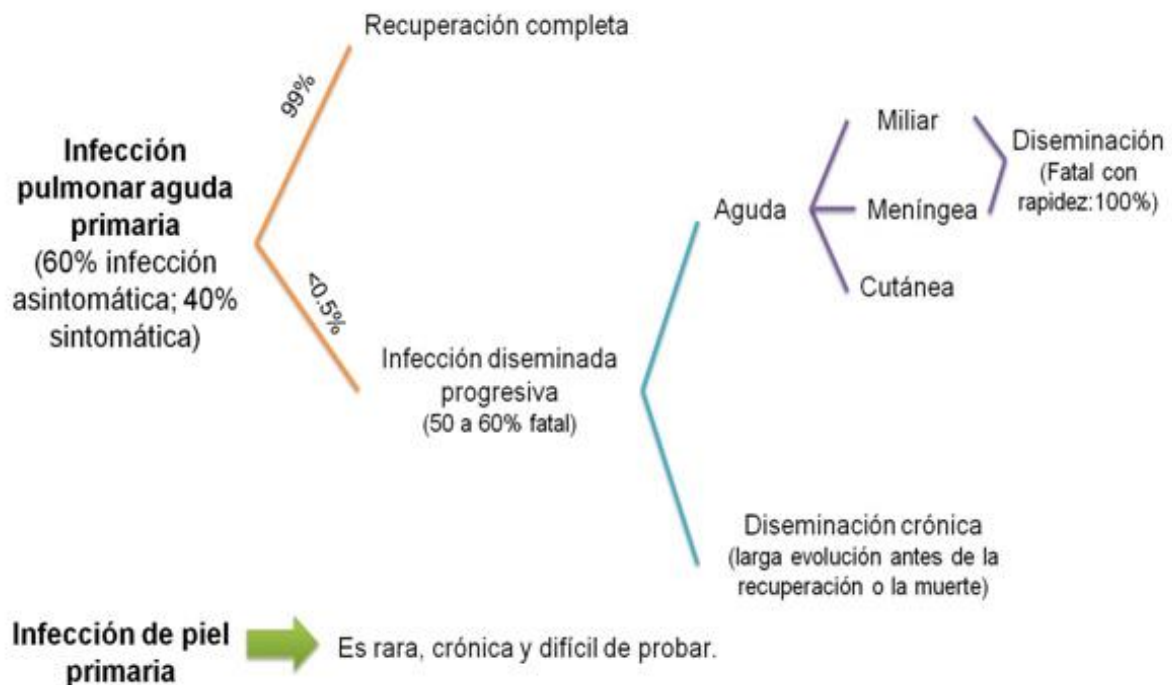


Figura 3. Formas clínicas de infección causadas por *Coccidioides* spp. modificado [14].

En México la epidemiología de la coccidioidomicosis es incierta y contradictoria. González-Ochoa señala que las regiones endémicas de esta micosis son: Baja California, Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, Coahuila, los valles tropicales de Colima, Michoacán y Guerrero [15]. Los informes de la Secretaría de Salud desde 1989 al 1994 reportan que los estados con mayor número de casos existieron en Nuevo León, Chiapas y Oaxaca [16], mientras datos del 2000 al 2013 fueron en Sonora, Baja California y Chihuahua [17].

Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) es una reacción enzimática que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de una sola molécula durante varios ciclos, utilizando la enzima polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* (*Taq*) [18], [19]. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de DNA a partir de las hebras originales que funcionan como molde o templado [20].

Los elementos que participan en la amplificación de la PCR son el templado (DNA), la enzima, los oligonucleótidos (cebadores o *primers*), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el cloruro de magnesio (MgCl₂), la solución amortiguadora y el agua altamente purificada. Estos elementos interactúan en las tres etapas de la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión [19]. El equipo en que se realiza la reacción se llama termociclador donde se establece el número de ciclos para las tres etapas, la duración de cada una y la temperatura.

La PCR es aplicada frecuentemente a ensayos de microorganismos en el ambiente, incluyendo el suelo. La simplicidad de esta tecnología, junto con su potencial para detectar pequeños números blancos de organismos sin la

necesidad de cultivar, fácilmente hace de esto un importante método para el monitoreo de patógenos [21].

PCR anidada

Una de las variantes de la PCR es la técnica anidada (PCR-n), la cual consta de dos reacciones, la primera incluye oligonucleótidos externos y la segunda oligonucleótidos internos que reconocen las secuencias encontradas en la primera amplificación, lo que determina una reacción más específica y sensible al templado del organismo estudiado [22].

Complejo de genes del DNA ribosomal y la región espaciadora transcrita

Las células eucariotas tal como los hongos tienen una región del complejo de genes del DNA ribosomal (rDNA). La organización de este complejo en los hongos incluye una secuencia codificante para el gen 18S rDNA, región espaciadora transcrita (ITS)1, la región codificante del gen 5.8S rDNA, otra región ITS (llamada ITS2) y la secuencia codificante para el gen 28S rDNA [23], (Figura 4).

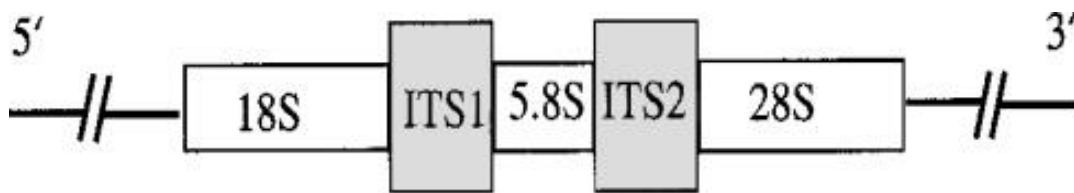


Figura 4. Representación del complejo de genes del rDNA en hongos y la posición de las regiones de ITS [23].

En los genes del rDNA se encuentran las mutaciones acumuladas, las cuales se presentan en una tasa constante pero lenta, a través del tiempo, por lo que la heterogeneidad de la secuencia de los nucleótidos, puede ser usada para la clasificación filogenética de los microorganismos [24].

Las regiones codificantes de los genes rDNA nuclear son 18S (1800 pb), 5.8S (160 pb) y 28S (3400 pb). Las mutaciones dentro de las ITS del complejo rDNA ocurre con mayor frecuencia que con los genes del rDNA, la heterogeneidad dentro esta área ha sido útil para la separación de género y especies [23].

ANTECEDENTES

Greene *et al* (2000), analizaron 720 muestras de suelo, colectadas en los años 1994, 1995 y 1997 del área endémica del Valle de San Joaquín, California. Todas las muestras fueron sembradas en el medio de Omieczynski y Swatek, preparado específicamente para el aislamiento de *Coccidioides* spp. A todos los cultivos que por morfología podrán ser *Coccidioides* spp., se les extrajo el DNA y se realizó una PCR multiplex (usando como genes blanco la región ITS y el 18S rDNA). Solo 4 de 720 muestras resultaron positivas, las cuales posteriormente se analizaron con la técnica de microsátelites [25] y fueron identificados cuatro genotipos diferentes, dos de ellos en un mismo cultivo [26].

De Macedo *et al.*, (2011), estudiaron 24 muestras de suelo colectadas en Caridade do Piauí y Elesbao Veloso, ambas regiones del estado de Piauí y como control negativo de la sabana, ambos de Brasil. Todas las muestras se inocularon en ratones; después de cuatro semanas, fueron sacrificados y sus tejidos fueron analizados mediante examen directo con KOH 10%, cultivados en agar Sabouraud al 2% con y sin ciclohexamida y procesados para análisis histopatológico. Asimismo, de las muestras de suelo, se extrajo DNA el cual fue amplificado mediante la técnica de PCR directa y PCR semi-anidada (usando cebadores de secuencias de la región 28S rDNA). *Coccidioides* sp. se recuperó en el 25% de los animales inoculados y se detectó solo en 8 de 24 (33.35%) de las muestras de suelo mediante PCR directa, mientras que por PCR semi-anidada todas las muestras fueron positivas [27].

Lauer *et al* (2012), recolectaron muestras del suelo de nueve localidades de Bakersfield, Condado de Kern, California (EUA) y llevaron a cabo una PCR multiplex de Greene (2000) modificada (extracción de DNA directa de muestras de suelos y reamplificando la banda de 223 pb) seguido por la purificación y secuenciación del amplicón. Identificaron a *C. immitis* en el 8.42% de 235 muestras colectadas en el año 2008 y en el 2.68% de 261 muestras colectadas en

el año 2009. La autora concluye que los factores ambientales influyen en la sensibilidad de la técnica para la identificación del hongo, porque la diferencia entre su estudio con el de Greene (2000), fue que las muestras de suelo analizadas eran recién colectadas y almacenadas hasta su análisis a una temperatura de -80°C [28].

Baptista-Rosas *et al.*, (2012) a través del diseño de un modelo geoespacial para predecir áreas endémicas de *Coccidioides* spp. extrajeron 90 muestras de suelos de Baja California, México: 20 muestras de San José de la Zorra (SJZ) y 70 de Valle de las Palmas (VDP). Para la detección del DNA de *Coccidioides* spp. utilizaron dos PCR's: inicialmente, una PCR amplificando la región ITS1-5.8S-ITS2 (subreino Dikarya) y la segunda amplificación (región ITS2 específica para *Coccidioides* spp.), fue obtenida mediante PCR-n. Los productos de la segunda PCR fueron secuenciados y comparados con la base de datos del *GenBank*. En total se identificaron 32 muestras positivas a *Coccidioides* spp. (5 de SJZ y 27 de VDP); sin embargo, 20 muestras resultaron en amplicones pertenecientes al género *Aphanoascus* spp. Su análisis bioclimático indica que los patrones fenológicos que ocurren en Baja California son similares a los descritos previamente en áreas endémicas de la coccidioidomicosis en Estados Unidos de Norte América [29].

Barker *et al.*, (2012) recuperaron 66 cepas de *Coccidioides posadasii* de 11 suelos (8.9%) de Tucson, Arizona usando la inoculación de ratón, la identificación con PCR multiplex de Greene (2000) y caracterizó los genotipos mediante los microsatélites de Fisher (1999). Encontraron que el suelo de Arizona contiene cepas diferentes de *C. posadasii* a las cepas de Texas, Sudamérica y México, confirmando amplia variabilidad genética entre cepas [30].

Johnson *et al.*, (2014), colectaron muestras de suelo del Monumento Nacional del Dinosaurio (noreste de Utah y noroeste de Colorado) y realizaron una serie de PCR anidadas con *primers* localizados en el complejo rDNA, seguido de una

purificación de productos de PCR y clonados dentro del vector *Escherichia coli* TOPO-TA pCR2.1, ambos fueron secuenciados y comparados con la base de datos del *GenBank* identificando a *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* [8].

Lauer A. *et al.*, (2014), investigaron si una combinación de imágenes Landsat y parámetros de suelo seguido del método de PCR múltiple de Greene (2000, modificado por Lauer 2012) para predecir localidades que podrían ser soportar el crecimiento de *Coccidioides immitis*. Se detectó al hongo en el 74% de las muestras, pero en 26% de estos sitios los resultados obtenidos por imágenes Landsat no coincidieron [31].

Litvintseva A.P. *et al.*, (2015) reportaron tres casos de coccidioidomicosis en el estado de Washington (condado de Benton), zona no endémica de la enfermedad, por lo que colectaron y analizaron 47 muestras de suelo de tres sitios distintos de Benton en dos periodos distintos, 2010 y 2014. Los suelos fueron estudiados usando CocciDx-PCR en tiempo real, ensayo desarrollado por el Instituto de Investigación Genómica Transnacional (TGen). De las muestras de suelos del 2010 el DNA de *Coccidioides* fue detectado en 6 muestras y en las del 2014 se detectó en 16 muestras. La información del genoma completo, fue la base para evaluar las relaciones filogenéticas entre cuatro aislados de suelo, seis cepas de California sin relación y un aislado clínico obtenido de uno de los pacientes de Benton. Los resultados indicaron que los aislados de Washington están relacionados con cepas colectadas en el Valle de San Joaquín. La detección de DNA de *Coccidioides* y la recuperación de aislamiento de los mismos suelos después de cuatro años sugiere que podrían ocurrir más infecciones en Washington [6].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La identificación de *Cocccidioides* spp a partir del suelo se ha efectuado mediante la inoculación en animales de experimentación, su cultivo *in vitro* y la detección de DNA de a partir de zonas consideradas endémicas de la enfermedad; todos estos métodos tienen una sensibilidad distinta; sin embargo, la tasa de identificación con cualquiera de estos procedimientos ha sido pobre.

OBJETIVOS

General

Estandarizar una técnica de PCR anidada para la identificación de *Coccidioides* spp., a partir de muestras de suelo inoculado con artroconidios.

Específicos

- Estandarizar la extracción DNA total del suelo.
- Diseñar oligonucleótidos internos y externos a partir de secuencias conservadas y variables del genoma de *Coccidioides* spp.
- Detectar DNA de *Coccidioides* spp. a partir muestras de suelos de zonas endémicas de coccidioidomicosis.

JUSTIFICACIÓN

En México no se ha aplicado ninguna técnica molecular para la identificación de *Coccidioides* spp. a partir del suelo, por lo que contar con una herramienta de este tipo tendría una importancia epidemiológica debido a que podría ser utilizada para localizar posibles fuentes de infección.

El desarrollo de una PCR anidada permitirá aumentar las probabilidades de la identificación de este patógeno en diferentes sustratos ya que ésta técnica tiene mayor sensibilidad y menor influencia de inhibidores que la PCR convencional.

HIPÓTESIS

Si en EUA, la utilización de PCR anidada ha sido efectiva para amplificar el DNA de *Coccidioides* spp a partir del suelo, entonces la implementación en México de este tipo de técnica, aumentaría las probabilidades de identificación del patógeno.

Si a partir de la región del complejo de genes del DNA ribosomal de *Coccidioides* spp., utilizada en la determinación de género y especies, se diseñan los oligonucleótidos para PCR anidada, entonces su especificidad será mayor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioseguridad

Los procedimientos de cultivo y la extracción de DNA de los aislados usados en este estudio, fueron realizados en cabina con Nivel de Bioseguridad 3.

Estandarización de PCR anidada con la cepa control

Diseño de oligonucleótidos

A partir de secuencias depositadas en *GenBank* se buscaron las correspondientes a *Coccidioides* spp enfocándose a la región genómica del complejo ribosomal (genes 18S, 5.8S y 28S DNA ribosomal) y las regiones espaciadores internas (ITS 1 y ITS2), regiones muy útiles debido a que el complejo tiene información muy conservada [24] y los espaciadores son variables, cualidades que tienen alta probabilidad de éxito en la identificación de las especies en estudio [32].

Oligonucleótidos internos

Se diseñaron los oligonucleótidos denominados PFI/PRI (Cuadro 2), mediante el programa Allele ID 7.8, en el cual se copió el número de acceso de la base de datos de las secuencias que contiene las regiones anteriormente mencionadas. Se seleccionó la secuencia de cada oligo y se analizaron en BLAST para verificar especificidad. Finalmente los oligos se analizaron con el software OligoAnalyzer 3.1 para conocer el porcentaje de las bases guanina y citosina, temperatura de alineamiento, peso molecular y número de nucleótidos. Los oligos se mandaron a sintetizar a los laboratorios CONDA, a través de Integrated DNA Technologies (IDT).

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos diseñados mediante las secuencias AB232892 y AB232897

Nombre	Secuencia	Tamaño	Contenido de GC	Tm	Peso molecular (g/mole)
PFE	5'- CGA TGA AGA ACG CAG CGA AAT -3'	21	47.6%	56.2 °C	6497.3
PRE	5'- ATG CAG CTC TAA GTG GGT GG -3'	20	55%	57.2 °C	6213.1
PFI	5'- CTG GTG TCT GAG TGT ATG -3'	18	50%	49.4 °C	5576.6
PRI	5'- AAG AAA CCA ACA GGG ATT -3'	18	38.9%	48.7 °C	5549.7

El producto de amplificación con los oligonucleótidos externos fue de 596 pb y con los internos de 135 pb.

Microorganismos

La cepa de *Coccidioides immitis* (Ci02) se empleó como referencia y control positivo para todos los experimentos, obtenida a partir de una muestra clínica, perteneciente a la colección de hongos de la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La recuperación de la cepa se obtuvo por cultivos polisporicos en agar dextrosa Sabouraud con cloruro de sodio al 3% (S+NaCl) tras 7-14 días de incubación a 26-28°C.

Como controles negativos se usaron cultivos de *Malbranchea* sp., *Blastomyces dermatitidis*, *Trychophyton rubrum* y *Candida glabrata*.

Extracción de DNA de cultivos de hongos

La cepa Ci02, así como los cultivos de *Malbranchea* sp., *Blastomyces dermatitidis*, *Trychophyton rubrum* y *Candida glabrata* fueron cultivados en agar papa dextrosa durante una semana a 28°C. El micelio fue recuperado en criotubos de 2 mL conteniendo perlas de vidrio, amortiguador de lisis y RNAsa (éstos dos últimos integrados en el kit de extracción comercial). El micelio fue lisado con el equipo

FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA) mediante un patrón con cuatro períodos de 40 s a velocidad de 6 m/s y entre cada período los tubos fueron colocados en un termo-bloque a 65°C durante cinco minutos.

La continuación de la extracción de DNA se realizó con las instrucciones del Kit comercial DNeasy Plant Mini (Qiagen GmbH, Hilden, GE) con el cual se obtienen cantidades de material genético suficiente, íntegro y puro que permitió llevar a cabo técnicas moleculares posteriores [33] [34].

Calidad y cantidad de DNA recuperado

Para conocer la integridad del DNA se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% disuelta con TBE (tris borato EDTA) 0.5 X (Figura 6). Se pesó la agarosa y se midió TBE, fueron colocados en un matriz y se calentaron en el microondas para disolver la agarosa, una vez enfriada la solución se agregó SYBR® Safe DNA Gel Stain (*invitrogen*) en una relación de 3 µL del intercalante por cada 100 mL del amortiguador, se cubrió con aluminio (debido a que el SYBR Safe® es sensible a la luz) y se dejó polimerizar. El gel se dispuso en una cámara de electroforesis nivelada que se llenó con TBE 0.5 X.

En papel parafilm se colocó 1µL de *buffer* de carga por cada 5µL muestra o 1µL de marcador de peso molecular y se homogeneizan con la punta de la pipeta. En el primer y último carril se colocó el marcador de peso molecular (Thermo Scientific, *Lambda* DNA/Hind III) y en cada uno del resto de los carriles, fueron colocadas las muestras de DNA extraído.

El gel se corrió a 90 V durante una hora en cámara de electroforesis cubierta con aluminio, al término del cual se visualizó en un transiluminador de UV (MacroVue UV-20 Transilluminator, Hoefer®).

El DNA extraído fue cuantificado con el espectrofotómetro (*Epoch™ Biotek*), y se estimó la pureza mediante la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm

(Cuadro 3). Los DNA's cuya proporción estuviera entre 1.7 y 2.0, se encuentra libre de contaminantes celulares [35]. Todos los DNA's, tanto los de los cultivos, como los obtenidos de los suelos, fueron conservados a -20°C hasta su uso.

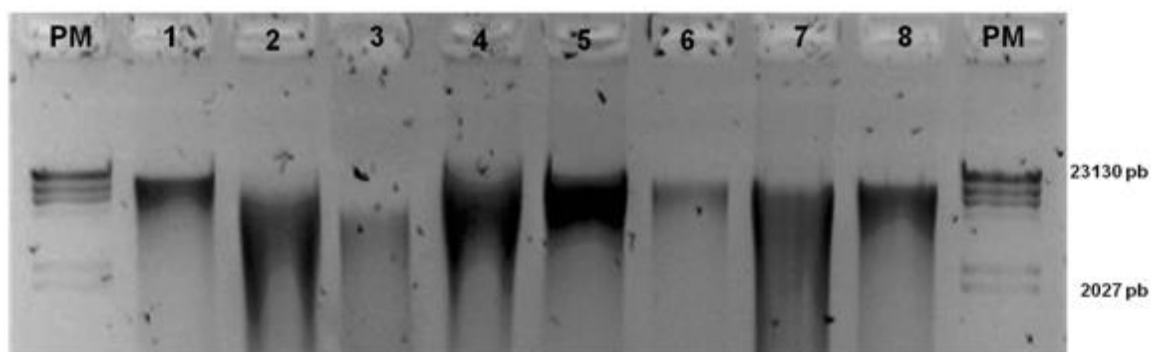


Figura 6. Gel de DNA 1.2%. En los carriles (1-5) DNA de hongos ascomicetos: 1) *Malbranchea* sp., 2) *Candida glabrata*, 3) *Trychophyton rubrum*, 4) *Blastomyces dermatitidis*, 5) *C. immitis* Ci02. En los carriles (6-8) DNA de suelos A (6), B (7) y C (8) inoculado con arthroconidios de *C. immitis*. PM = marcador de peso molecular.

Cuadro 3. Concentración de DNA de hongos ascomicetos y de Ci02.

	Concentración (ng/μL)	A _{260/280}
<i>Coccidioides immitis</i> (Ci02)	65.1	1.8
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	131.7	1.7
<i>Trychophyton rubrum</i>	14.7	1.7
<i>Candida glabrata</i>	90.2	1.7
<i>Malbranchea</i> sp.	54.8	1.7

Curvas de cloruro de magnesio y temperatura

Se diseñó una PCR de dos reacciones conjuntas, una primera ronda con el par de cebadores PFE/PRE y en la segunda ronda se empleó el par PFI/PRI.

En la primera y segunda ronda de PCR, se evaluaron tres concentraciones de cloruro de magnesio ($MgCl_2$): 2, 2.5 y 3 mM a tres diferentes temperaturas de alineamiento 55°C, 57°C y 59°C. Para mejorar el rendimiento de la PCR [18] se utilizó leche descremada (Leche Light, Santa Clara).

La primer ronda se efectuó con 1 ng/ μ L de DNA genómico de la cepa Ci02 y de los cultivos de *Malbranchea* sp. *Blastomyces dermatitidis*, *Trychophyton rubrum* y *Candida glabrata*. En la segunda ronda de PCR se utilizaron 5 μ L de la amplificación en la primera ronda. Las condiciones de las mezclas de reacción se describen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de la mezcla de reacción para la estandarización.

	Primera ronda	Segunda ronda
	Concentración final	
Agua Milli Q	--	--
Buffer (10 mM Tris (pH 9.0), 500 mM KCl)	1X	1X
Mix dNTPs	0.2 mM	0.2 mM
MgCl₂	2, 2.5 y 3 mM	2, 2.5 y 3 mM
PF	0.2 μ M	0.17 μ M
PR	0.2 μ M	0.17 μ M
Leche Descremada 1:10	0.5 μ L	0.5 μ L
Taq DNA polymerase	1.25 U	1.5 U
Templado de DNA	1 ng/ μ L	5 μ L
Volumen final	25 μ L	25 μ L

Condiciones de amplificación

Como se mencionó, el programa de amplificación, varió en la temperatura de alineamiento, dejando constantes el resto de las condiciones como se muestra en el cuadro 5.

Se observó que en la primera ronda son suficientes 25 ciclos de amplificación, mientras que para la segunda se necesitaron 35 ciclos.

Cuadro 5. Programa de amplificación para la estandarización

Características		Temperatura (°C)	Tiempo	
			1a ronda	2a ronda
Desnaturalización		95	5 min	
Ciclos	Desnaturalización	95	30 s	20 s
	Alineamiento	55/57/59	30 s	20 s
	Extensión	72	1 min	20 s
Extensión final		72	3 min	5 min

Electroforesis

Se esperó un amplicón de 135 pb, para lo cual el producto de PCR de la segunda ronda se visualizó mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, utilizando las mismas condiciones de electroforesis mencionadas anteriormente para DNA.

Prueba de sensibilidad

La concentración mínima de DNA necesario para la amplificación o determinación del límite de detección de la técnica, se obtuvo al usar la PCR-n diseñada con diferentes concentraciones de DNA proveniente del cultivo de la cepa Ci02 (desde 10 ng/μL hasta 1 fg/μL).

Secuenciación de la cepa Ci02

La identificación de la cepa Ci02, se obtuvo con la secuenciación de los productos de los amplicones, los cuales se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las secuencias obtenidas se editaron en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, seguido de un *Blast* en el *GenBank* y por último se alinearon con el programa Clustal Omega.

Estandarización de PCR anidada con suelo inoculado con artronidios

Suelos para la inoculación de artronidios

Para la estandarización de la técnica de PCR-n diseñada con suelos, se usaron tres tipos de suelos no perturbados (A, B y C) pertenecientes al estado de Oaxaca, donados por la Doctora María del Pilar Ortega Larrocea del Instituto de Geología, UNAM.

Conteo de artronidios

A partir del crecimiento de la cepa Ci02 en agar S+NaCl se preparó una suspensión madre de conidios del hongo. La suspensión se hizo depositando 1.5 mL de solución de Tween 80 al 0.01% estéril, en el tubo de cultivo y con una asa bacteriológica se frotó suavemente la superficie del cultivo para desprender artrosporas del micelio. La suspensión se recuperó en tubos Eppendorf estériles y se agitó con vórtex aproximadamente tres minutos. Se tomó 1 μ L de la solución, se depositó en un portaobjetos y se revisó la proporción de conidios no unidos a la hifa; si los conidios separados eran pocos, el procedimiento con el vórtex se repitió cuantas veces fuese necesario hasta confirmar el mayor porcentaje de esporas separadas. Al observar que la mayoría de los artronidios se encontraban desprendidos, se efectuaron los conteos con la cámara de Neubauer o hematocitómetro. El conteo se repitió cuatro veces, se obtuvo el promedio de las cuentas y se estimó la concentración de esporas utilizando siguiente fórmula:

concentración de esporas/mL= promedio de esporas x 5 x 10⁴ [36].

Inoculación de suelo con arthroconidios de Coccidioides immitis

Los suelos A, B y C son considerados no perturbados por lo que sus características son completamente naturales a diferencia de los suelos artificiales o alterados por actividad humana.

Se calculó el 60-65% de capacidad de campo en cada uno de los tres tipos de suelos, para lo cual se tamizaron y se pesaron en una lata previamente perforada en la base y con un círculo de papel peñón en su interior. Los suelos dentro de la lata fueron humedecidos con agua y se dejaron escurrir hasta que se mantuvo un peso constante (100% de capacidad de campo). Los suelos se dejaron secar a temperatura ambiente hasta obtener una capacidad de humedad del 60% [(peso constante*60%)/ 100%].

Posteriormente, cada suelo fue inoculado con la mayor cantidad de arthroconidios obtenida durante el conteo, que fueron 42,043 arthroconidios/mL de la cepa Ci02 dentro de tubos Falcon y se incubaron durante 14 días a 26-28°C.

Extracción de DNA de muestras de suelo

La extracción de DNA de los tres suelos inoculados con arthroconidios de Ci02 (Figura 6, cuadro 6) se efectuó con el kit comercial *FastDNA™ SPIN Kit for Soil*. (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, EUA). Se usaron aproximadamente 500 mg de cada uno de los suelos y fueron colocados en los criotubos con perlas provenientes del kit; se siguieron las instrucciones del proveedor con la única modificación de que la lisis se efectuó en el equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA) mediante un patrón con cuatro períodos de 40 s a velocidad de 6 m/s y entre cada período los tubos fueron colocados en un termo-bloque a 65°C durante cinco minutos.

Cuadro 6. Concentración de DNA de los tres suelos inoculados con artroconidios.

	Concentración (ng/μL)	A_{260/280}
Suelo A	640.7	1.6
Suelo B	443.2	1.8
Suelo C	119.6	1.86

Curvas de de cloruro de magnesio y temperatura

La realización de curvas de cloruro de magnesio y de temperatura descritas anteriormente, se llevó a cabo en los DNA's de los tres tipos de suelo inoculados con artroconidios de Ci02

Prueba de sensibilidad

Se determino la concentración mínima de DNA metagenómico del suelo inoculado con artroconidios de Ci02 para la amplificación de *Coccidioides* spp. (desde 100 ng/ μ L a 1 fg/ μ L).

Secuenciación del suelo inoculado con artroconidios

Asimismo, se mandaron a secuenciar los suelos inoculados con artroconidios, a la Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las secuencias obtenidas se editaron en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, seguido de un *Blast* en el *GenBank* y por último se alinearon con el programa Clustal Omega.

PCR anidada: suelos de regiones con casos humanos de coccidioidomicosis

Finalmente se utilizó 10 muestras de suelo recolectadas en el año 2013 de la casa de un paciente con diagnóstico de coccidioidomicosis, que residía en Morelia, Michoacán, México y siete muestras por duplicado provenientes de Bakersfield, California, EUA zona endémica de coccidioidomicosis (muestras colectadas por la doctora Antje Lauer en 2009).

RESULTADOS

Estandarización de PCR anidada con la cepa control

Prueba de especificidad y concentración de cloruro de magnesio y temperatura

Se usaron DNA's de otros ascomicetos y ninguno diferente a *Coccidioides immitis*, amplificó en las reacciones. El utilizar leche descremada 1:10 permitió que productos inespecíficos disminuyeran y así aumentara la eficiencia de la PCR (Figura 7).

Las amplificaciones obtenidas en las curvas, se observaron mejor con una concentración de 3 mM de MgCl₂ y una temperatura de alineamiento de 59°C, por lo que esos datos se consideraron como la concentración final de trabajo para la primera ronda de PCR. Para la segunda ronda, las curvas demostraron que la concentración óptima de trabajo fue también de 3mM de MgCl₂ a una temperatura de 55°C.

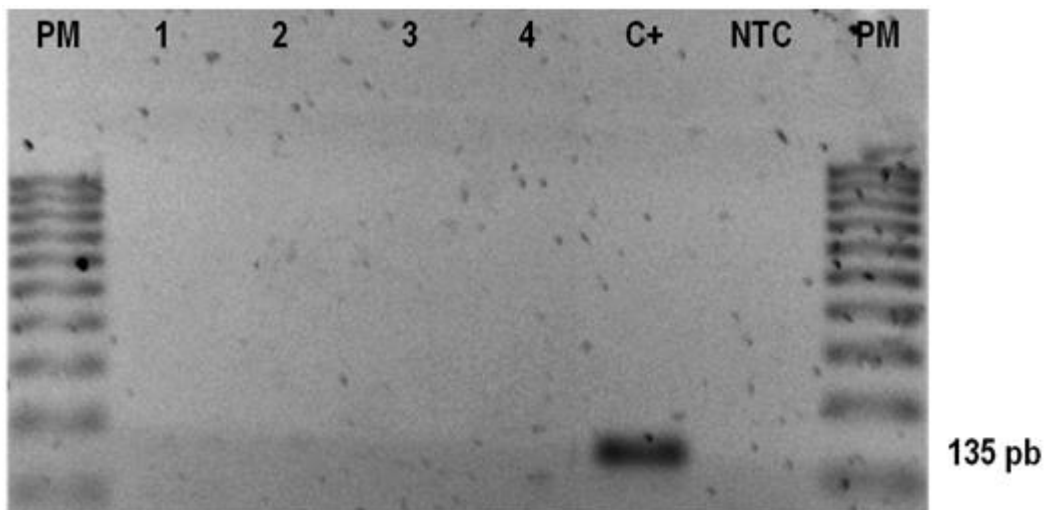


Figura 7. Prueba de especificidad de PCR anidada con cuatro ascomicetos diferentes. 1= *Malbranchea* sp., 2= *Blastomyces dermatitidis*, 3= *Trychophyton rubrum*, 4= *Candida glabrata*, C+= *Coccidioides immitis*, NTC= sin templado.

Prueba de sensibilidad

La prueba de sensibilidad demostró que la concentración mínima de DNA puro de Ci02 con la que hubo amplificación fue de 100pg/ μ L (Figura 8).

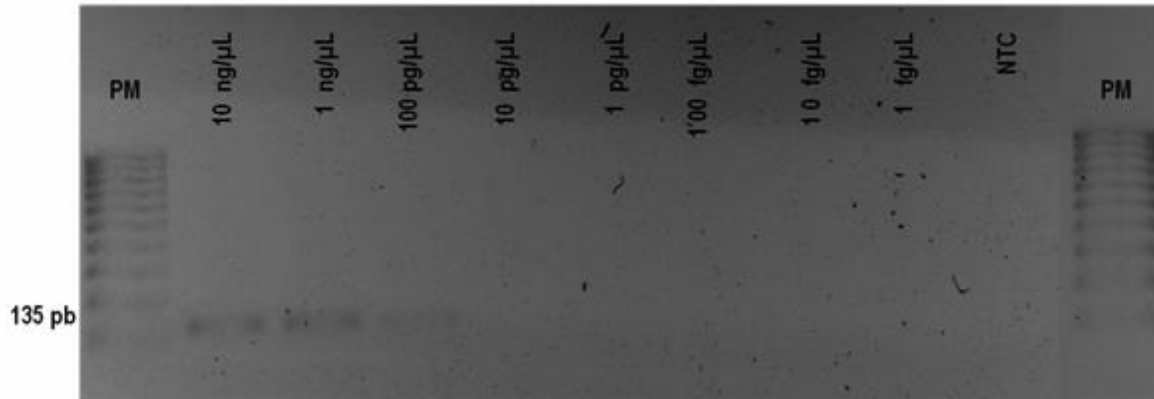


Figura 8. Prueba de sensibilidad de DNA de Ci02, NTC= sin templado.

Secuenciación de la cepa Ci02

La comparación de las secuencias obtenidas de los productos de amplificación de la cepa control (Ci02) mostraron una identidad mayor a 86% para *Coccidioides immitis* con otros números de accesos en el *GenBank* (Figura12).

Estandarización de PCR anidada con suelo inoculado con artronidios

Curvas de de cloruro de magnesio y temperatura

La evaluación de las concentraciones de $MgCl_2$ y de temperatura de alineamiento concordó con los obtenidos con la Ci02 y los cultivos de hongos ascomicetos. Asimismo, en los suelos A y B no se pudo observar amplificación (Figura 9). En la segunda ronda, se observaron amplificaciones inespecíficas en la temperatura 57°C y en las tres concentraciones de $MgCl_2$ de la segunda ronda; mientras que en la temperatura de 59°C la banda fue menor a 100 pb (Figura 10).

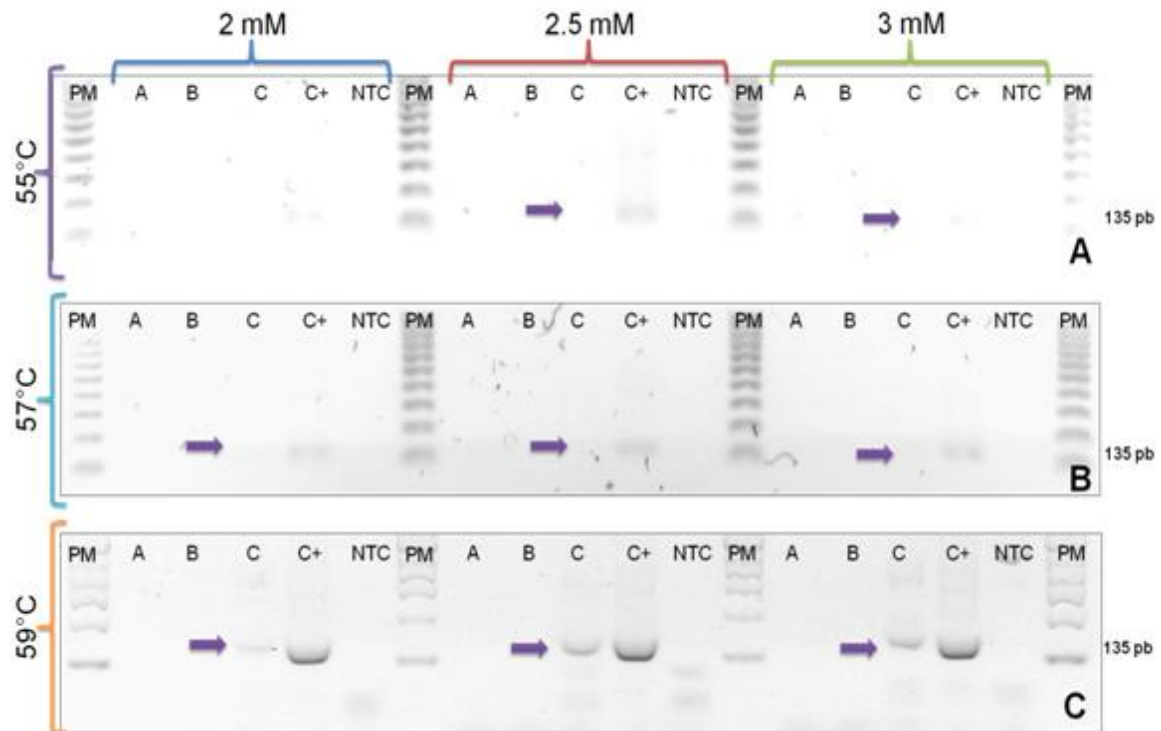


Figura 9. Evaluación de diferentes concentraciones de cloruro de magnesio a una temperatura de alineamiento 55°C (A), 57°C (B) y 59°C (C) en la primera ronda de PCR anidada a diferentes concentraciones de MgCl₂ (2.0; 2.5 y 3.0 mM) a partir de DNA total de suelo inoculado con artroconidios suelo A, B y C, Ci02 (C+) y sin templado (NTC). Las flechas rojas indican la presencia de banda observado sólo en el transiluminador.

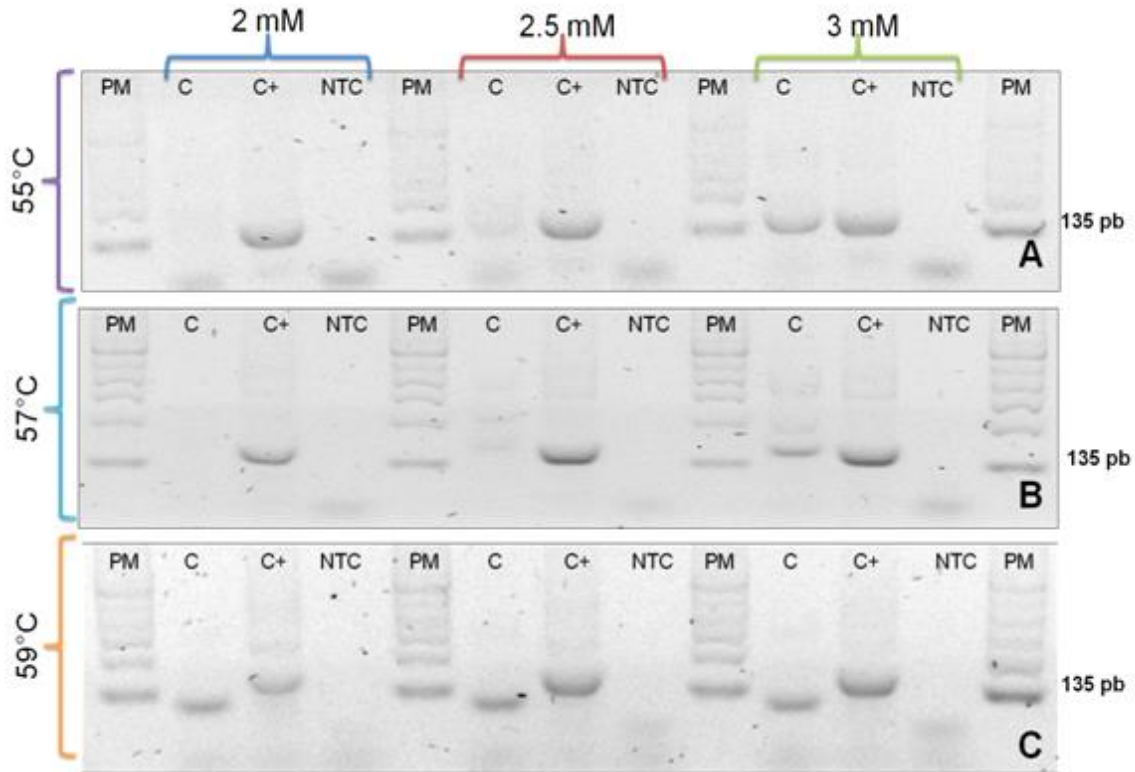


Figura 10. Evaluación de diferentes concentraciones de cloruro de magnesio a una temperatura de alineamiento 55°C (A), 57°C (B) y 59°C (C) en la segunda ronda de PCR anidada a diferentes concentraciones de MgCl₂ (2.0; 2.5 y 3.0 mM) a partir de DNA total de suelo C inoculado con artroconidios (C), Ci02 (C+) y sin templado (NTC).

Prueba de sensibilidad

A partir del suelo C inoculado con artroconidios, el límite de detección fue de 1 ng/μL de DNA metagenómico para la amplificación de *Coccidioides* spp. (Figura 11).

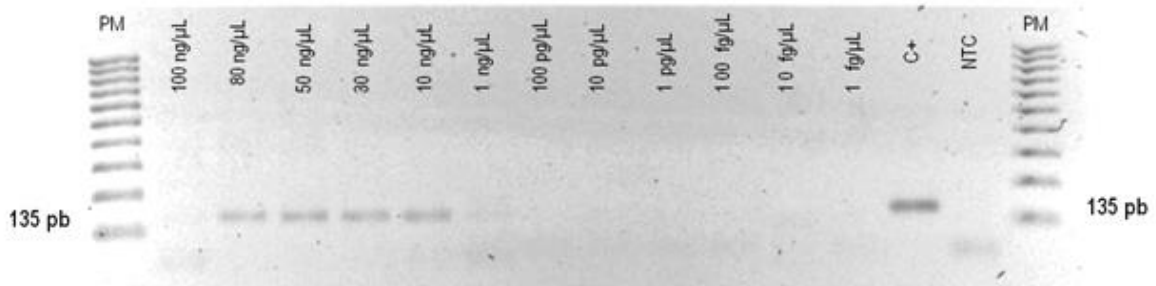


Figura 11. Prueba de sensibilidad de DNA de suelo C inoculado con artroconidios. C+= Ci02 y NTC= sin templado (NTC).

Secuenciación del suelo inoculado con *artroconidios*

La comparación de las secuencias obtenidas de los productos de amplificación de los controles positivos (suelo C) mostraron una identidad mayor a 86% para *Coccidioides immitis* con otros números de acceso del *GenBank*, asimismo se mostró similitudes entre la Ci02 y el suelo inoculado con artroconidios (Figura 12).

```
Suelo
Ci02
gi|693261137|gb|KJ783447.1|
gi|73912448|dbj|AB232893.1|
gi|73912452|dbj|AB232897.1|
-----AATCACTTCATCGCTCAAAGACCCGATCGGGCCGATCTTTTTTTTATATA
-----CCAAATTTTTTTTATT
GTATGGGAAATCACTTCATCGCTCAAAGACCCGATCGGGCCGATCTTTTT-TTTTTATA
GTATGGGAAATCACTTCATCGCTCAAAGACCCGATCGGGCCGATCTTTTTTTTTTATA
GTATGGGAAATCACTTCATCGCTCAAAGACCCGATCGGGCCGATCTTTTTTTTTTATA
* ** *** **

Suelo
Ci02
gi|693261137|gb|KJ783447.1|
gi|73912448|dbj|AB232893.1|
gi|73912452|dbj|AB232897.1|
C-GGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTATAACC-----
CCGGTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
TCCGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
TCCGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
TCCGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
* ***** *

Suelo
Ci02
gi|693261137|gb|KJ783447.1|
gi|73912448|dbj|AB232893.1|
gi|73912452|dbj|AB232897.1|
A-GGAAAAGAAACCAACAGGGATT-----
A-GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAA
A-GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAA
GAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAA
```

Figura 12. Alineamiento de las secuencias de suelo inoculado con Ci02 y la cepa Ci02 con otras secuencias (AB232897.1, AB232893.1 y KJ783447.1).

PCR anidada: suelos de regiones con casos humanos de coccidioidomicosis

DNA y PCR anidada de las muestras de suelo de zonas endémicas de coccidioidomicosis

La extracción de DNA fue mayor a 12.5 ng/ μ L en todas las muestras con una relación de absorbancia ($A_{260/280}$) entre 1.6 a 2.4 (Cuadro 7 y Fig. 13). La detección de *Coccidioides* spp. de las muestras de suelo fueron negativas en ambas regiones (Morelia, México y Baskerfield, EUA).

Cuadro 7. Concentración de DNA obtenido de las muestras de suelo perteneciente a California, EUA y a Morelia en México.

Muestra	Concentración (ng/μL)	A_{260/280}	Concentración (ng/μL)	A_{260/280}
CALIFORNIA, EUA				
Round Mountain I	57.5	2.02	64.7	1.9
Round Mountain II	53.6	1.87	84	1.9
Ant-Hill	14.5	2.4	19.3	2.3
Lake Webb	18	2.27	12.7	1.7
CSOB Floodplain	88.9	1.88	97.6	1.6
Children's Center	40.4	1.6	97.1	1.6
Bike path West	120.4	1.6	127.3	1.6
MORELIA, MÉXICO				
	Concentración (ng/μL)		A_{260/280}	
Muestra 1	26.6		2.3	
Muestra 2	83.3		1.85	
Muestra 3	51.2		1.9	
Muestra 4	51.6		1.95	
Muestra 5	113		1.9	
Muestra 6	64.6		1.95	
Muestra 7	198.6		1.86	
Muestra 8	278.3		1.7	
Muestra 9	185.6		1.8	
Muestra 10	132.2		1.9	

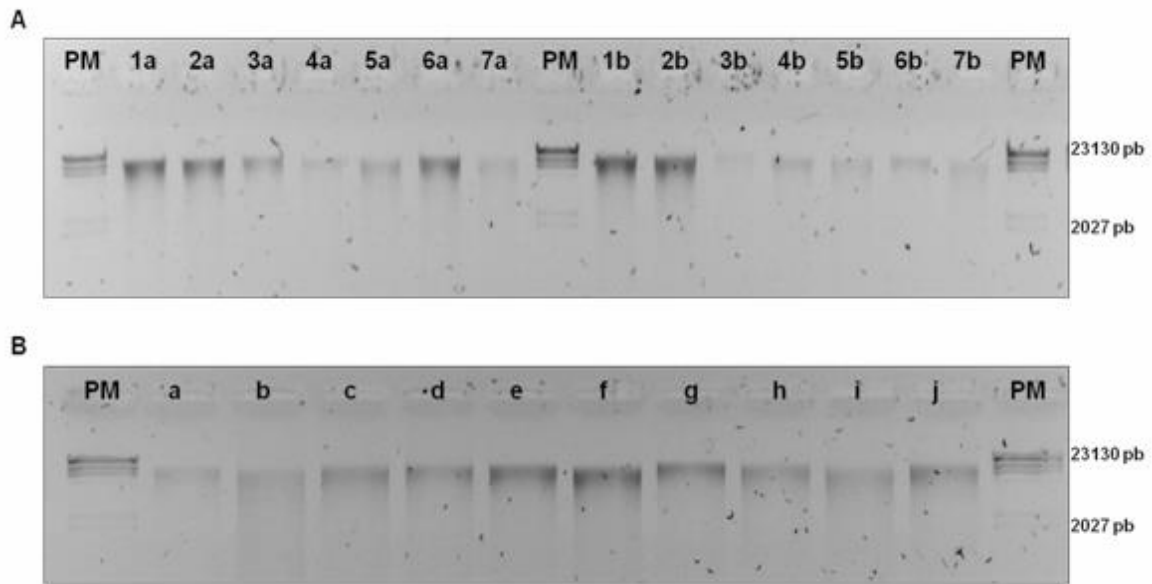


Figura 13. Gel de DNA 1.2% de muestras de suelo pertenecientes a California, EUA (A) y de Morelia, México (B). En las muestras de California (A) se realizó la extracción por duplicado (1a-7a) y (1b-7b). PM= peso molecular.

DISCUSIÓN

La nula detección de DNA de *Coccidioides* spp. en los suelos A y B, pero sí en el suelo C, demuestra que el tipo de suelo es un parámetro importante para el desarrollo o crecimiento del hongo [5] y que existen componentes en los diferentes tipos de suelo, que inhiben la actividad de la polimerasa [37].

Lo anterior, implicaría la posibilidad de que en la naturaleza, el hongo se pueda encontrar como saprobio del suelo; sin embargo, las características fisicoquímicas y biológicas de ese sustrato no aseguran las condiciones necesarias para el crecimiento del hongo [31], lo que no podría permitir que exista una cantidad suficiente de masa fúngica para su aislamiento *in vitro* o la extracción de suficiente DNA que pueda ser amplificado. Consecuentemente, en los diferentes intentos de hacer la identificación del hongo, inclusive en suelos de áreas consideradas altamente endémicas de coccidioidomicosis, éstos han fallado muy posiblemente no porque el hongo no sea habitante de estos ambientes, sino porque su crecimiento no es suficiente.

Los ensayos efectuados demuestran que la sensibilidad de la técnica, en al menos 1 ng/ μ L del DNA metagenómico del suelo, la concentración mínima detectable de DNA de *Coccidioides* spp es de 100 pg/ μ L. Asimismo, la especificidad de la PCR diseñada fue exitosa porque no hubo amplificación de DNA de otros hongos ascomicetos cercanos y alejados filogenéticamente de *Coccidioides* spp.

Las condiciones de trabajo óptimas para la identificación de *Coccidioides* spp. incluyen 1 ng/ μ L de DNA partir de un medio de cultivo u 80 ng/ μ L de DNA de la muestra de suelo en una mezcla de reacción de un volumen total de 25 μ L en ambas rondas. La primera ronda, se necesita una concentración final de Buffer 1 X (10 mM Tris (pH 9.0), 500 mM KCl), 0.2 mM dNTPs, PRE/PFE; 0.2 μ M, 1.25 U/ μ L *Taq* polimerasa y agua milliQ. Los ciclos de la reacción incluye un paso de desnaturalización inicial en 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos a 95°C durante 30

segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguido por una extensión a 72°C durante 3 minutos. La reacción de la segunda ronda de PCR fue similar con la excepción de añadir 1.5 U/ μ L *Taq* polimerasa, 5 μ L de la primera reacción como templado y un segundo par de *primers* (PRI/PFI; 0.17 μ M) tuvo un programa de ciclo a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos a 95°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos, seguido por una extensión a 72°C durante 5 minutos. Los reactivos de la mezcla de reacción son menores comparados con otros trabajos [8], [26], así como el tiempo de la corrida [27], [28].

La extracción de DNA de *Coccidioides* y su amplificación por PCR a partir del suelo C, demuestra que la técnica de extracción y la PCR propuesta son eficientes. Por los resultados obtenidos en los suelos A y B, la falla de detección del DNA del hongo, podría estar relacionada con la cantidad de arthroconidios utilizados, porque al ser suelos que no soportan el crecimiento del hongo y la competencia biótica existente en la naturaleza, es probable que con una mayor concentración de arthroconidios inoculados, se hubiese podido obtener resultados positivos; sin embargo, estos resultados no estarían imitando las condiciones naturales.

La secuenciación determinó que la técnica de PCR diseñada permite identificar DNA de *Coccidioides* spp. tanto a partir de una muestra de suelo como de un cultivo puro, con una confiabilidad de identificación mayor a 86% comparada con secuencias depositadas en el *GenBank*. La secuencia de suelo inoculado con Ci02 se encuentra más cercana al extremo 5' que la de la cepa Ci02; aun así se superponen ambas secuencias. Por otra parte, se observan algunas variables en las pares de las bases del suelo inoculado y Ci02, este resultado es similar al estudio de Greene *et al* [26] donde a partir de una muestra obtiene dos genotipos y por último la comparación con otros números de acceso del *GenBank* (Figura 12) se puede observar variabilidad entre la especie [30].

El DNA metagenómico, extraído de las muestras de suelo colectadas en Morelia, México y Baskerfield, EUA, cumplió con la concentración e integridad necesarias para la identificación de *Coccidioides* spp; sin embargo, los resultados de amplificación negativos nos demuestran la ausencia del hongo o que la cantidad de DNA de *Coccidioides* spp. estaba debajo del límite de detección de este método de PCR.

Al ser muestras de suelos de regiones endémicas de coccidioidomicosis, la probabilidad de identificar al hongo era alta; sin embargo, la literatura menciona que la sobrevivencia y desarrollo del hongo puede ser alterada por las condiciones en el muestreo, así como la forma y tiempo de almacenamiento de los suelos, por lo que, las posibles explicaciones de los resultados negativos obtenidos en esas muestras de suelo son:

- Las condiciones de preservación no fueron las adecuadas y por lo tanto tuvieron un cambio significativo en la composición del suelo [28], [38], [39].
- Existen sustancias húmicas en el suelo (entre otros, ácidos fúlvicos y tánicos) que forman complejos con iones de metales, los cuales inhiben la amplificación de DNA extraído de este material [37], [40].
- *Coccidioides* spp. no estaba presente en las muestras problema.

En esta parte experimental las muestras de suelo fueron congeladas a -20°C , permitiendo la preservación de todos los elementos bióticos y abióticos presentes desde el momento de la colecta, además, la literatura menciona que la adición de la leche descremada en la PCR disminuye en buena proporción a los inhibidores naturales del suelo [40]. Finalmente, los hallazgos de los ensayos con suelos A, B y C permiten apoyar fuertemente la hipótesis de que el crecimiento de *Coccidioides* spp. depende de características físico-químicas y bióticas específicas del suelo [5]; por lo que las muestras de zonas consideradas endémicas de la enfermedad podrían no haber cumplido esas condiciones específicas para el desarrollo del hongo.

CONCLUSIÓN

El diseño de oligonucleótidos de la región del rDNA de *Coccidioides* spp. junto con su uso en la estandarización de una PCR-n, permitió identificar a *Coccidioides* spp. a partir de suelo, sin tener reacción cruzada con otros ascomicetos. La confirmación de los resultados por secuenciación, permiten proponer la técnica diseñada para la identificación del hongo a partir de suelos y de aislados puros.

Debido a la facilidad de ejecución, la técnica de PCR-n diseñada podrá emplearse en la búsqueda de DNA del hongo a partir de sustratos naturales como el aire y vegetales de regiones endémicas, lo que extendería la probabilidad de encontrar fuentes ambientales relacionadas con las formas de infección para los mamíferos y abriría nuevas alternativas de estudio de epidemiología de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- [1] Fisher M, Koenig G, White T, Taylor J. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002; 94:73-84.
- [2] Pan S, Sigler L, Cole GT. Evidence for a phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). *Mycrobiology* 1994; 140:1481-1494.
- [3] Sharpton TJ, StajichJE, Rounsley SD, Gardner MJ, Wortman JR, Jorfar VS, Maiti VS, Kodira CD, Neafsey DE, Zeng Q, Hung CY, McMahan C, Muszewska A, Grynberg M, Mandel MA, Kellner EM, Barker BM, Galgiani JN, Orbach MJ, Kirkland TN, Cole GT, Henn MR, Birren BW, Taylor JW. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 2009; 19:1722-31.
- [4] Li J, Yu L, Tian Y, Zhang K. Molecular evolution of the deuterolysin (M35) family genes in *Coccidioides*. *PLoS One* 2012; 7:1-11.
- [5] Fisher FS, Bultman MW, Johnson SM, Pappagianis D, Zaboroky E. *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States: a matter of scale. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1111:47-72
- [6] Litvintseva AP, Marsden-Haug N, Hurst S, Hill H, Gade L, Driebe EM, Ralston C, Roe C, Barker BM, Goldoft M, Keim P, Wohrle R, Thompson GR 3rd, Engelthaler DM, Brandt ME, Chiller T. Valley fever: finding new places for an old disease: *Coccidioides immitis* found in Washington State soil associated with recent human infection. *Clin Infect Dis* 2015; 60:e1-e3.
- [7] Baptista-Rosas RC, Hinojosa A, Riquelme M, Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1111:35-46.
- [8] Johnson SM, Carlson EL, Fisher FS, Pappagianis D. Demonstration of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* DNA in soil samples

- collected from Dinosaur National Monument, Utah. *Med Mycol* 2014; 52:610-7.
- [9] Nguyen C, Barker BM, Hoover S, Nix DE, Ampel NM, Frelinger JA, Orbach MJ, Galgiani JN. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:505-25.
- [10] Muñoz-Hernández B, Palma-Cortés G, Cabello-Gutiérrez C, Martínez-Rivera MA. Parasitic polymorphism of *Coccidioides* spp. *BMC Infect Dis* 2014; 14:213.
- [11] Lewis ER, Bowers JR, Barker BM. Dust devil: The life and times of the fungus that causes Valley fever. *PLoS Pathog* 2015; 11:1-7.
- [12] Mandel MA, Barker BM, Kroken S, Rounsley SD, Orbach MJ. Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition. *Eukaryot Cell* 2007; 6:1189-99.
- [13] Egeberg RO, Elconin AE, Egeberg MC. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *J Bacteriol* 1964; 88:473-6.
- [14] Converse JL, Reed RE. Experimental Epidemiology of Coccidioidomycosis. *Bacteriol Rev* 1966; 30:678-695.
- [15] Gonzalez-Ochoa A. Coccidioidomycosis in Mexico. En Ajello Libero, ed. *Coccidioidomycosis*. Phoenix, Arizona. Proceedings of the 2nd Coccidioidomycosis Symposium. 293-296.
- [16] Anuarios de morbilidad: Información epidemiológica de 1989-1994. Dirección general de epidemiología. Secretaría de Salud. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- [17] Bases de datos en formato estándar de 2000-2013. Dirección general de información en salud. Secretaría de Salud. <http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/estandar.html>

- [18] Espinosa AL. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: *Ecología Molecular*. México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.2007; 517-540.
- [19] Tamay de Dios L, Ibarra L, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Inv Discapacidad* 2013; 2:70-78.
- [20] Serrato-Díaz A, Flores-Rentería L, Aportela-Cortez J, Sierra-Palacios E. PCR. Reacción en cadena de la polimerasa. En: *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México. INECC-SEMARNAT. 2014; 53-73.
- [21] Volossiouk T, Robb E J, Nazar R N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:3972-76.
- [22] Frías de León MG, Taylor ML, Hernández-Ramírez A, Reyes-Montes MR. Utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la histoplasmosis. *Rev Mex de Micol* 2007; (25): 83-90.
- [23] Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; 40:87-109.
- [24] Wu Z, Tsumura Y, Blomquist G, Wang XR. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5389-97.
- [25] Fisher MC, White TJ, Taylor JW. Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Mol Ecol* 1999; 8:1082-4.
- [26] Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor J W. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2000; 92:406-410.

- [27] de Macêdo R, Rosado AS, da Mota FF, Cavalcante M, Eulálio KD, Filho A, Martins L, Lazéra M, Wanke B. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiol* 2011;11: 108.
- [28] Lauer A, Baal JD, Baal JC, Verma M, Chen JM. Detection of *Coccidioides immitis* in Kern County, California, by multiplex PCR. *Mycologia* 2012; 104:62-9.
- [29] Baptista-Rosas RC, Catalán-Dibene JC, Romero-Olivares AL, Hinojosa A, Cavazos T, Riquelme M. Molecular detection of *Coccidioides* spp. from environmental samples in Baja California: linking Valley fever to soil and climate conditions. *Fungal Ecol* 2012; 5:177-190.
- [30] Barker BM, Tabor JA, Shubitz LF, Perrill R, Orbach MJ. Detection and phylogenetic analysis of *Coccidioides posadasii* in Arizona soil samples. *Fungal Ecol* 2012; 5:163-176.
- [31] Lauer A, Talamantes J, Castañón-Olivares LR, Medina LJ, Baal JD, Casimiro K, Shroff N, Emery KW. Combining forces – The use of landsat TM satellite imagery, soil parameter information, and multiplex PCR to detect *Coccidioides immitis* growth sites in Kern County, California. *PLoS One* 2014; 9:1-14.
- [32] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:6241-6.
- [33] Dineen SM, Aranda R 4th, Anders DL, Robertson JM. An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. *J Appl Microbiol* 2010; 109:1886-96.
- [34] Alejos-Velazquez LP, Aragón-Martínez M, Cornejo-Romero A. Extracción y purificación de ADN. En: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México. INECC-SEMARNAT. 2014; 1-52.

- [35] Rada T, Gonzalo A, Taboada L. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular. Biofarbo 1998; 6:63-66.
- [36] Ames T, Cañedo V. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Perú. CIP; 1-62.
- [37] Enkerli Jürg, Widmer F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. BioControl 2010; 55:17-37.
- [38] Lauber CL, Zhou N, Gordon JI, Knight R, Fierer N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. FEMS Microbiol Lett 2010; 307:80-6.
- [39] Goberna M, Insam H, Pascual JA, Sánchez J. Storage effects on the community level physiological profiles of Mediterranean forest soils. SBB 2005; 37:173-178.
- [40] De Boer S H, Ward L J, Li X, Chittaranjan S. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. Nucleic Acids Res 1995; 23:2567-2568.