

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Estudio preliminar de las características fenotípicas de *Coccidioides* spp, por medio de halotolerancia y termotolerancia en la fase saprobia”

Informe de Tesis

Ricardo Mendizábal Burastero

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Mayo de 2011

Junta Directiva

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Galvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska de León	Vocal V

Dedicatoria

A Dios, por haberme permitido cumplir este logro

A mis padres, Francisco y Primina, por haberme dado todo el cariño y amor enseñado a dar siempre lo mejor de mí, y buscar siempre ser excelente.

A mi hermano Rodrigo y su familia, gracias por tantos momentos de alegría, y por permitirme la oportunidad de ser tío.

A mis abuelos: Felipe y Gladys; Riccardo (Nonno) y Adela (Nonna)

A Karen López, por haber sido mi compañera y mi apoyo durante todos estos años.

A mis amigos:

- De la U: Hugo, Cristy, Claudia, Ana, Carlos; gracias por tantos momentos juntos, viajes fallidos y exitosos.
- Los QBs: Astrid, Ligia, Veronica, Silvana y Enrique; gracias por acompañarme y hacer tan alegre ese camino que se llama ser QB
- De la Clínica: Claudia R., Claudia E., Joan, Alejandra, Jackie, Amalia, Sabrina; gracias por hacer de cada día una experiencia diferente ir a trabajar.

Agradecimiento

Al Lic. Osbert Morales Esquivel, por su constante apoyo y ayuda en la realización de esta tesis.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por permitirme realizar la fase experimental en las instalaciones.

A la Sección de Microbiología del Hospital Roosevelt, en especial a las Licdas. Remei Gordillo y Margarita Boluoux, por su colaboración y consejos.

A la Clínica de Enfermedades Infecciosas, al Dr. Carlos Mejía y la Licda.

Sandra Terraza, por confiar en mí al darme una oportunidad de trabajo, y a todos mis compañeros por hacer de la Clínica mi segundo hogar.

Índice

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	
A. Definición	4
B. Historia	4
C. Agente Etiológico	6
D. Ecología	8
E. Epidemiología	11
F. Presentación Clínica	13
G. Diagnostico	17
H. Tratamiento	24
IV. Justificación	26
V. Objetivos	27
VI. Hipótesis	28
VII. Materiales y Métodos	29
VIII. Resultados	38
IX. Discusión de Resultados	41
X. Conclusiones	44
XI. Recomendaciones	45
XII. Referencias	46
XIII. Anexos	53

I. Resumen

La coccidioidomicosis es una micosis respiratoria, causada por dos especies del género de hongos *Coccidioides*. Esta micosis esta causada por *Coccidioides* spp. Hasta el año 2001, se conocía que *C. immitis* era la única especie del género que causaba coccidioidomicosis, sin embargo, en el año 2002 Fisher y colaboradores comprobaron que la coccidioidomicosis era causada por dos especies diferentes del género *Coccidioides*, identificando una nueva nombrada como *C. posadasii* (1,3, 9).

El objetivo del presente estudio fue determinar preliminarmente la especie de *Coccidioides* como agente causal de coccidioidomicosis en el país, teniendo como base las características fenotípicas que diferencian a las especies: halotolerancia y termotolerancia. Se confirmó inicialmente que las cepas a evaluar pertenecieran al género *Coccidioides* spp, por medio de sondas Accuprobe. A estos aislamientos se le evaluaron dos parámetros de crecimiento en fase saprobia: a) la halotolerancia, la cual se determinó en medio YEG con concentraciones de cloruro de sodio de 2%,4% y 6%; y b)la termolerancia, por medio de crecimiento a 37°C en medio YEG. Los resultados de halotolerancia se compararon por medio de un análisis de varianza contra una cepa control de *C. posadasii*, mientras que los resultados de termotolerancia se analizaron por medio de la ecuación descrita por Barker y colaboradores (32).

Los resultados obtenidos con estas pruebas comprobaron que todas de las cepas evaluadas en el estudio correspondieron a la especie *C. posadasii*, constituyendo este hallazgo en el primer reporte de la especie para el país.

II. Introducción

La coccidioidomicosis o enfermedad de Posadas-Wernike es una micosis sistémica causada por *Coccidioides* spp. Este género de hongos dimórficos es endémico de zonas áridas y semiáridas, que se encuentran desde el suroeste de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (1).

Hasta el año 2001, se conocía que *C. immitis* era la única especie del género que causaba coccidioidomicosis, considerando que los aislamientos se dividían en dos grupos: la variante California (CA) y variante no California (no-CA). Sin embargo, en el año 2002, Fisher y colaboradores comprobaron que la coccidioidomicosis es causada por dos especies diferentes del género *Coccidioides*, identificando una nueva, nombrada como *C. posadasii*. De acuerdo a estos resultados, la nueva especie se encuentra distribuida desde México hasta Suramérica y por lo tanto en estas regiones la coccidioidomicosis es ocasionada exclusivamente por *C. posadasii* (2,3).

Guatemala es un área endémica de esta enfermedad, encontrándose los focos en el oriente del país, específicamente en el valle del Motagua, lo cual ha sido confirmado mediante la prueba de intradermorreacción, que indica la exposición a *Coccidioides*. En estos estudios se ha encontrado una prevalencia de 26.55% en el Departamento de Zacapa, lo que permite considerar esta zona como de alta endemia (4-6).

A pesar de que en la actualidad aún no se ha encontrado diferencias en tratamiento o presentación clínica entre las especies del género, se ha descrito que existen diferencias entre la virulencia y dosis infectiva entre las especies del género. A nivel de alta virulencia

no existen diferencias entre las especies, sin embargo, las cepas de baja virulencia correspondieron solo a *C.posadasii*, y en la actualidad se está estudiando otras diferencias a nivel de patogenia(7).

Por otra parte, se tiene descrito dos diferencias fenotípicas entre las especies, como los son la halotolerancia y termotolerancia. En este aspecto, *C.immitis* tiene capacidad de tolerar mayores concentraciones de cloruro de sodio *in vitro* en comparación con *C. posadassi*. Sin embargo, *C. posadasii* presenta tolerancia a crecer en fase miceliar a 37°C, mientras que la otra especie no presenta esta capacidad. Esto es indicativo que cada especie tiene facultades diferentes para adaptarse a su hábitat, ya sea a nivel ecológico o a nivel patogénico (2,8).

Debido a estas razones, se considera importante identificar preliminarmente la especie de *Coccidioides* agente causal de coccidioidomicosis en el país, para sentar las bases que servirán en estudios epidemiológicos para el reporte correcto de casos, y que en el futuro, con los nuevos descubrimientos en el campo, tendrá un impacto en el manejo clínico de la enfermedad.

Esto se logró mediante la evaluación de cinco cepas provenientes de aislamientos clínicos, almacenados en el Cepario del Servicio de Micología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Se determinó la halotolerancia en medios de cultivo con diferentes concentraciones de cloruro de sodio; así como la termotolerancia en fase saprobia a 37°C; ya que ambas son características fenotípicas que permiten la identificación preliminar de la especie de *Coccidioides*.

III. Antecedentes

A. Definición

La coccidioidomicosis es una micosis de origen respiratorio, causada por dos especies del género de hongos *Coccidioides*. Esta patología que tiene una amplia gama de presentaciones clínicas, cuyo curso puede ser asintomático, benigno, grave o fatal (1,9).

Desde su descubrimiento, esta enfermedad se ha conocido con diversos nombres, entre los que se pueden destacar fiebre del Valle de San Joaquín, fiebre del Valle, fiebre del Desierto, granuloma coccidioidal y enfermedad de Posadas-Wernike, por mencionar algunos (6).

B. Historia

La coccidioidomicosis fue descrita inicialmente en 1892 en Argentina, por Alejandro Posadas. Este descubrimiento fue confirmado por Robert Wernike, en el mismo año, en otro caso con similar presentación clínica. Ambos casos fueron descritos como granuloma coccidial (una presentación poco común a nivel subcutáneo), evidenciando en estos un agente causal de tipo infeccioso, el cual fue catalogado inicialmente como un protozoo, debido a su similitud con el protozoo del orden *Coccidia* (3).

El agente causal fue descrito con más detalle por Rixford y Gilchrist en 1896, quienes lo nombraron como *Coccidioides immitis*, pero considerándolo aún como un protozoo. La clasificación taxonómica correcta fue realizada en 1900, por Ophüls y Moffit

por medio del aislamiento en un medio de cultivo artificial, donde observaron el crecimiento de micelio, con lo cual se estableció que *Coccidioides* era un hongo (3,10).

La relación como agente causal de la enfermedad fue demostrada inicialmente al inocular arthroconidios en diversos animales de laboratorio, pero fue en 1937, cuando Dickson lo relacionó como agente causal de la llamada Fiebre del Valle de San Joaquín o Fiebre del Valle, una infección a nivel pulmonar (11).

En Centroamérica, el primer caso en humanos fue descrito por Castro y Trejos, en 1950, en una paciente proveniente de Honduras. En Guatemala, el primer caso humano fue descrito por Perez y Rosal en 1960, en un habitante de Gualán, Zacapa (4,5).

En 1997, Koufopanou y colaboradores describieron a través de un análisis genealógico por medio de la secuenciación de genes dos *taxa* diferentes, variante California (CA) y variante no California (no-CA), encontrándose la primera circunscrita al Valle de San Joaquín, California, y la segunda correspondiente a los aislamientos del resto de América (12).

En 2002, por medio de análisis filogenéticos, Fisher y colaboradores describieron una nueva especie, que nombraron *Coccidioides posadasii*, en honor al descubridor de la enfermedad, Alejandro Posadas. Esta especie corresponde a los aislamientos previamente descritos como variante no-CA, mientras que los aislamientos correspondientes a la variante CA corresponden a la especie *Coccidioides immitis* (3).

C. Agente Etiológico

El agente causal de la coccidioidomicosis son ambas especies del género *Coccidioides*, *C. immitis* y *C. posadasii* (anexo 1). Estos hongos pertenecen al reino *Fungi*, Phylum *Ascomycota*, Clase *Euascomycota*, Orden *Onygenales*, familia *Onygenaceae*. *Coccidioides* es un género de hongos que se presenta en los tejidos del hospedero una forma parasítica llamada esférula y una forma miceliasaprobiasaprobia. Esta interconversion entre una y otra forma, es determinada por las condiciones de temperatura del hospedero, por lo que es considerado térmicamente dimórfico (13,12).

En la fase saprobiasaprobiasaprobia se presenta como micelio septado, que produce artroconidios tálicos con forma de barril, que alternan con células disyuntivas, que son células que sufrieron un proceso de autólisis. En cultivos viejos se puede observar la presencia de hifas en raqueta e hifas en espiral. Macroscópicamente, se observa en cultivos como un micelio blanco algodonoso. (15-17).

Estos artroconidios, que son células uninucleadas que miden entre 3 μm y 5 μm , son la forma infectiva del hongo y basta con la inhalación de un solo artroconidio para generar la infección. Al ingresar, las condiciones del hospedero, como la temperatura y los nutrientes, causan la interconversion de la fase saprobiasaprobiasaprobia a la fase parasítica. (15,18).

En la fase parasítica, se observa el hongo como una esférula conteniendo endosporas. Las esférulas son estructuras redondas con doble pared refringente, de aproximadamente 70 μm de diámetro, que contienen pequeñas esporas en su interior, llamadas endosporas. Al romperse las esférulas, liberan las endosporas causando la

propagación del hongo en el hospedero (ver anexo 2). A pesar de que la presentación más común en el hospedero es la presencia de esférulas, se han observado en raras ocasiones, formas miceliales en los tejidos del hospedero, donde se observa micelio septado y artroconidios en forma de barril. (15, 19-21).

En *Coccidioides* no se ha observado reproducción sexual o estado telomórfico. A pesar de que se han realizado diversos intentos de reproducción sexual *in vitro*, no se ha podido observar este tipo de reproducción. Sin embargo a nivel molecular, se ha descrito la existencia de reproducción sexual. Esto fue comprobado al realizar la genotipificación de una serie de aislamientos clínicos, donde se observó que el genotipo de aislamientos de un mismo paciente era idéntico, pero que éste era diferente entre varios pacientes, lo que indica que existe una recombinación de genes, compatible con una reproducción de tipo sexual (22-24).

La reproducción sexual en los hongos, se encuentra determinado por el *locus* MAT, que se define como tipo sexual o “mating type”, que determina la compatibilidad reproductiva. Por medio de un análisis genómico y secuenciación directa, se ha descrito la presencia de un *locus* MAT en aislamientos de *Coccidioides*, diferente en las dos especies del género. Esto indica que la reproducción sexual ocurre en la fase saprobia del hongo a nivel de su hábitat natural, pero no puede ser recreada en el laboratorio, y que ambas especies del género, *C. immitis* y *C. posadasii*, no pueden reproducirse entre ellas. (22-24).

D. Ecología

Coccidioides es endémico de regiones áridas o semiáridas, con escasa vegetación y una baja precipitación pluvial anual. El tipo de suelo de su hábitat natural es de una textura arenosa, rico en sales minerales como sodio, cloruro, magnesio, potasio y otros. En estos suelos también se ha encontrado una alta cantidad de amonio, lo cual tiene una relación con la producción de ureasa por parte de *Coccidioides*, enzima que hidroliza la urea, produciendo dióxido de carbono e ión amonio. Esta enzima la expresa el hongo tanto en su fase saprobia como en su fase parasítica. El hongo crece en suelos alcalinos, aunque se ha comprobado que el hongo soporta un amplio rango de pH, desde 2 hasta 9. La producción de amonio es una manera de alcalizar el pH del medio en donde se encuentra (18, 25, 26).

La humedad del suelo es un factor muy importante para el ciclo de vida de *Coccidioides*. Se ha inferido que muchos de los hongos son homoiohidricos, que significa que el nivel de agua en el interior de la célula depende directamente de la humedad de su entorno. Por tal razón, la humedad incide directamente en el ciclo de vida del hongo, y además interviene en su diseminación. En épocas de alta precipitación pluvial, la incidencia de casos de coccidioidomicosis disminuye y de manera inversa, aumentan los casos conforme disminuye la precipitación pluvial y la humedad (27, 28).

Generalmente, en áreas endémicas existe una precipitación pluvial de entre 5 cm y 50 cm anuales, aunque se han descrito zonas endémicas con hasta 66 cm anuales. En estos casos, el agua de lluvia se cree que gran parte se evapora, lava o se infiltra en el suelo, evitando su acumulación, lo cual impediría el crecimiento de *Coccidioides* (27, 28).

Las condiciones de humedad fluctúan en dos escenarios: alta humedad y baja humedad. En condiciones de alta humedad, que puede llegar a un 95 por ciento, se propicia el crecimiento del micelio, que sucede durante la época de precipitación pluvial. En cambio, en condiciones de baja humedad, que puede alcanzar un 10 por ciento, el hongo forma artroconidios, que son estructuras de mayor resistencia, además de ser su forma infectiva. Por tal razón, en época seca, aumenta la incidencia de coccidioidomicosis en las zonas endémicas (27, 28).

Debido a su tamaño, un factor importante para su diseminación es el viento. Las corrientes de viento fragmentan el micelio del hongo, así liberando sus artroconidios. Debido al tamaño de los mismos (entre 3 μm y 5 μm) se ha utilizado por diversos investigadores la concentración de partículas menores de 10 μm (PM_{10}) como una variable sustituta para conocer la concentración de *Coccidioides* en la atmosfera, ya que la medición de PM_{10} se encuentra adecuadamente estandarizada. Se ha descrito una correlación directa entre el aumento de PM_{10} y la incidencia de casos de coccidioidomicosis. A pesar de esto, no se considera un buen predictor de la incidencia, debido a que no se conoce la relación directa entre la concentración de PM_{10} y la concentración de *Coccidioides* (28, 29).

Entre *C. immitis* y *C. posadasii*, no se conocen diferencias ecológicas, debido a la ausencia de estudios de este tipo, aunque *in vitro* se han encontrado diferencias entre ambas especies con respecto a la halotolerancia y termotolerancia (30).

Para ambas especies, la salinidad del suelo es de alta importancia para su crecimiento. La halotolerancia se ha considerado como un factor importante para el crecimiento, principalmente como factor inhibidor de especies competidoras. Se ha descrito los efectos de las sales de calcio y sodio como inhibidores *in vitro* de diversos competidores del hábitat natural de este género, tales como *Bacillus subtilis* y *Penicillium janthinellum*, los cuales fueron inhibidos a concentraciones altas de ambas sales (3, 30, 31).

Con respecto a la temperatura, se ha observado que ambas especies presentan el mayor crecimiento a 30°C, y el menor a 20°C, *in vitro*. En estas condiciones, se ha observado que existe una diferencia entre las especies, ya que *C. possadassi* crece más rápidamente a 37°C que *C. immitis*. A pesar de que *in vitro* no presentan crecimiento a más de 50°C, se ha observado que pueden soportar *in vivo* estas temperaturas en su fase micelial. Esto se debe a que *Coccidioides* no se encuentra en la superficie del suelo, sino que generalmente se encuentra entre 4 a 12 pulgadas debajo de la superficie, con lo que se logra una protección contra los rayos ultravioleta, la desecación y altas temperaturas (17, 30, 32).

Con respecto a sus requerimientos nutricionales, se conoce que, al igual que otros hongos patógenos, en su hábitat natural posee una gran capacidad de utilizar una variedad de compuestos como fuente de carbón y nitrógeno, obteniendo estos de derivados de material orgánico en los suelos (30).

Se ha descrito que, a pesar de esta gran capacidad de utilizar diversas cantidades de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno, tiene un sistema de discriminación de traslocación de aminoácidos y en medios de cultivo suplementados con L-acido aspártico y L-histidina, no se observa crecimiento. Además de poder absorber los aminoácidos, también puede utilizar los iones nitrato y nitrito como fuente de nitrógeno. Con respecto al consumo de carbohidratos, pueden utilizar una amplia variedad de estos, tanto pentosas, hexosas, disacáridos y oligosacáridos. Cabe destacar que a diferencia de su estado parasítico, en el estado miceliar es capaz de absorber la lactosa, como fuente de carbono y energía (30).

E. Epidemiología

La región endémica de coccidioidomicosis se encuentra exclusivamente en el continente americano, distribuida de norte a sur. Esta zona corresponde a las regiones calidas-áridas del sureste de Estados Unidos, noreste de México y diversos focos endémicos en Centro y Suramérica, aunque existe muy poca información sobre estos últimos (33).

En Guatemala, Mayorga describió el Valle de Motagua en Zacapa, la única zona endémica adecuadamente descrita y documentada en el país, aunque se cree que existen otras zonas endémicas (4,5).

La mayoría de estudios para describir las áreas endémicas se basan en pruebas de intradermorreacción (IDR), con un antígeno purificado de *Coccidioides*, conocido también como coccidoidina. Una reacción positiva a esta prueba indica contacto previo con el hongo (6).

El área de mayor endemia en todo el mundo, es el Condado de Kern, en California, Estados Unidos, con un índice de pruebas de IDR positivas de 90 por ciento o mayor. El Condado de Kern es parte del Valle de San Joaquín, primera área endémica conocida para la enfermedad. En el dicho valle, la endemidad disminuye conforme las poblaciones se encuentran más hacia el norte del país. Otras áreas de endemidad en Estados Unidos son Maricopa y Pima, en Arizona, con una positividad de más del 50 por ciento para la prueba de intradermorreacción (33).

Otra área de alta endemia es México. En diversos estudios realizados, se han descrito diversas áreas endémicas, donde la tasa de prevalencia por IDR varía desde un 95 por ciento en Coahuila hasta un 12 por ciento en Sonora, siendo ambos estados parte del norte del país. El problema con estos estudios es que han sido realizados en grupos poblacionales muy pequeños (menores a 2000 personas), y por tal razón pueden no representar la situación real de estas zonas. En el único estudio a gran escala fue realizado en 1966, las zonas de Baja California, Sonora, Chihuahua y Sinaloa; todos estados del norte de México. Dichos estados presentaron tasas más elevadas de IDR, mayores al 50 por ciento. Esto coincide con los reportes de casos, donde la mayor incidencia corresponde a pobladores de las áreas del norte del país (34, 35).

En Centroamérica se han descrito dos áreas endémicas: el Valle del Motagua, en Guatemala y el Valle de Comayagua en Honduras. En Guatemala, se ha observado en diferentes estudios una positividad a IDR entre el 33 y 26 por ciento. La región descrita, agrupa los municipios de Zacapa, Teculután, Rio Hondo, Gualán, Sanarate, El Progreso y San Agustín Acasaguastlán (4-6).

El resto de regiones endémicas se encuentran en Sudamérica. La principal se encuentra en Venezuela, en los estados de Falcón, Lara y Zulia. En Brasil, se han descrito varias áreas endémicas en el norte del país, en los estados de Piauí, Bahia, Caerá y Maranhão. Esta son regiones semiáridas, con condiciones climáticas muy similares a zonas endémicas de Norteamérica. Otras áreas importantes en Sudamérica son el Valle del Chaco en Paraguay, algunas áreas de la Patagonia en Argentina y los departamentos de Guajira y Magdalena en Colombia (18, 36, 37).

F. Presentación Clínica

La infección por *Coccidioides* tiene una amplia variedad de presentaciones clínicas. Esta variedad está determinada principalmente por una relación entre la inmunidad del huésped, el tamaño del inóculo al cual se ha expuesto y factores específicos de virulencia o resistencia, que aún se encuentran en estudio. La mayor parte de casos, alrededor del 60%, transcurren como infecciones con poco o ningún síntoma respiratorio (14).

Las presentaciones clínicas de coccidioidomicosis pueden dividirse en primarias y secundarias (15).

1. Coccidioidomicosis primaria

La coccidioidomicosis primaria tiene dos formas de presentación características: pulmonar y cutánea. Este tipo de presentación, se caracteriza por la consecuencia directa a la exposición a la fase infectiva del hongo (15).

a. Coccidioidomicosis primaria pulmonar

La infección por *Coccidioides* se presenta luego de la inhalación de artroconidios. La exposición determina una infección respiratoria, con cuadro febril leve o moderadamente grave en la mayor parte de afectados, pero que suele ser autolimitada, aunque en un 40 por ciento de los sujetos expuestos, desarrollan infección pulmonar sintomática (18). En la mayoría de casos, la presentación pulmonar es asintomática y se hace evidente la exposición al hongo por medio de la realización de una prueba de intradermorreacción o coccidioidina (15). En los casos de infección pulmonar sintomática, el período de incubación es de una a tres semanas posterior a la exposición, presentando un cuadro clínico muy similar a la tuberculosis. Los pacientes presentan malestar, anorexia, escalofríos, fiebre, cefalalgia, dorsalgia, sudores nocturnos y pleuresía, tos con escasa expectoración mucosida o mucopurulenta. En una radiografía de tórax, se puede observar la presencia de infiltrados, efusión pleural y adenopatía hialina. Alrededor de un 5 por ciento de población infectada desarrolla residuos asintomáticos en los pulmones, usualmente nódulos o cavidades (1,6).

b. Coccidioidomicosis primaria cutánea

Esta es una forma rara de coccidioidomicosis, se observa luego de la implantación traumática de los artroconidios en la piel. El primer caso fue descrito en 1927, en un paciente que sufrió un pinchazo con una espina de cactus. En este caso, se desarrolló una lesión parecida a un chancro, observándose adenitis regional, resolviéndose espontáneamente en pocas semanas (38). Se han establecido reglas estrictas para poder describir adecuadamente casos bien documentados de forma cutánea (39):

- Ausencia de historia pulmonar antes del apareamiento de la enfermedad.
- Traumatismo previo al apareamiento de la lesión (sitio de inoculación).
- Periodo corto de incubación, entre una y tres semanas luego de la inoculación.
- Lesión relativamente indolora, firmemente indurada con ulceración central, similar a un chancro sifilítico.
- Curación espontánea en un lapso de pocas semanas (a excepción de pacientes inmunológicamente comprometidos).
- Linfangitis y linfadenopatía en la región de drenaje (similar a la encontrada en esporotricosis).
- Resultado positivo a prueba cutánea de coccidioidina, con sensibilidad aumentada.

2. Coccidioidomicosis secundaria

La forma secundaria es consecuencia de una coccidioidomicosis primaria, la cual progresa hasta afectar otros órganos (15).

La infección secundaria puede ocurrir meses e inclusive años luego de la exposición primaria al hongo. En ésta, las endoesporas se diseminan a través del sistema linfático y del sistema circulatorio, hacia todos los órganos. A pesar de esto, se observan más comúnmente en piel, nódulos linfáticos y sistema esquelético (14).

A pesar de ser poco común, la forma meníngea cobra una gran importancia, ya que puede ocurrir meningitis, meningoencefalitis o meningomielitis, observándose síntomas neurológicos y psiquiátricos, además de poderse complicar con hidrocefalia, cuadriplejia o paraplejia. Por otra parte, la forma meníngea puede confundirse con formas meníngeas de otros microorganismos, como *Histoplasma capsulatum* y *Mycobacterium tuberculosis*. Esto se debe a que presentan similar correlación con datos clínicos previos (manifestación pulmonar), aspecto del líquido cefalorraquídeo similar, observándose disminución de la glucosa y tendencia a hidrocefalia por bloqueos en la circulación del líquido cefalorraquídeo. En el caso de meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans*, al realizar pruebas como tinta china o aglutinación en látex para el antígeno de *C. neoformans*, se puede descartarlo como agente causal (15, 40).

La coccidioidomicosis miliar es una forma de enfermedad secundaria progresiva. En esta, hay manifestaciones de deficiencia pulmonar progresiva, ocurriendo una diseminación a nivel hematógico y linfático, con el desarrollo de pequeños granulomas en pulmones y

otros órganos. Generalmente presenta un desenlace fatal, a menos de que se trate de inmediato, aunque comúnmente esta presentación se asocia a pacientes inmunocomprometidos, también se han reportado casos en pacientes inmunocompetentes (41).

El granuloma coccidioidal es otra forma de enfermedad progresiva poco común. Puede presentarse en forma de una neumonía coccidioidea progresiva, con un lento desarrollo, con síntomas como tos crónica, anorexia, fiebre, hemoptisis, disnea y dolor torácico (18, 42).

G. Diagnóstico

El diagnóstico de coccidioidomicosis presenta una serie de complicaciones. La metodología considerada como el estándar de oro es el cultivo, pero presenta inconvenientes de tiempo y solo puede ser realizada en laboratorios con adecuadas condiciones de bioseguridad. Por otro lado, otras pruebas diagnósticas como la serología, permiten obtener resultados rápidos y son muy útiles para el diagnóstico, a pesar de que no presentan una especificidad tan alta como el cultivo; además, son muy utilizadas para el monitoreo y seguimiento de un paciente (43).

1. Hematología

Las alteraciones hematológicas son poco específicas, pero pueden dar un indicio de una reacción inflamatoria. Se observa una elevada velocidad de eritrosedimentación y eosinofilia, en etapas tempranas o en un repunte de la infección (43)

2. Histopatología

Debido a la reacción inflamatoria que causa, los cambios tisulares se pueden dividir en iniciales y tardíos. En la fase inicial, incluye una reacción con un aumento de células polimorfonucleares, mientras que en la fase tardía se observan células granulomatosas. Conforme las endoesporas maduran a esférulas, ocurre una reacción granulomatosa predominantemente compuesta por linfocitos, células plasmáticas y células gigante multinucleadas (43, 44).

A nivel de microscopía, es posible observar esférulas, de un diámetro de entre 10 y 100 μm , las cuales pueden contener endoesporas, de diámetros entre 2 y 5 μm ; lo cual se considera patognomónico, pero no puede considerarse como un diagnóstico definitivo. El microorganismo se hace evidente en una preparación en fresco con hidróxido de potasio (KOH), en cortes histológicos con blanco de calcofluor, metamina de plata de Grocott (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS) y hematoxilina-eosina (HE). Entre estas, se considera que la tinción de GMS presenta una mayor sensibilidad sobre las otras tinciones, aproximadamente del 22%, en especímenes clínicos (14, 43).

3. Serología

Las pruebas serológicas son de utilidad en el diagnóstico de coccidioomicosis, debido a que a pesar de que no proporcionan un diagnóstico definitivo, si proporcionan un resultado rápido a comparación con el cultivo. En la actualidad, se ha descubierto que las

pruebas serológicas son menos sensibles de lo que se creía inicialmente, principalmente en casos autolimitados en pacientes inmunocomprometidos (43)

a. Pruebas basadas en inmunidad celular

La intradermorreacción (IDR) es la prueba de elección basada en la inmunidad celular. Esta prueba es altamente sensible y en áreas no endémicas, puede utilizarse como un apoyo diagnóstico, pero en áreas endémicas se pueden observar porcentajes de reactividad que varían de un 10% a un 90%, por lo que se solamente se utiliza como una prueba para determinar exposición previa al hongo. Esta prueba se realiza con los antígenos coccidioidina o esferulina, el primero es un antígeno miceliar y el segundo un polisacárido presente en el citoplasma de las esférulas (15).

La prueba se hace positiva entre dos días y tres semanas luego del inicio de los síntomas y puede persistir positiva por años. En presencia de síntomas, una reacción positiva se correlaciona con un buen pronóstico, debido a una buena respuesta adecuada de inmunidad celular, en cambio una prueba negativa indica un mal pronóstico (44).

b. Pruebas basadas en inmunidad humoral

La presencia de anticuerpos tipo IgM o IgG en un huésped infectado, no indican protección hacia el hongo, sino que indican el nivel de actividad patógena del hongo. Por tal razón, la detección cualitativa de anticuerpos sirve no solo para diagnóstico sino para pronóstico de la infección (45).

La detección de IgM se basa en la precipitación en tubo, apareciendo los anticuerpos en la primera semana de síntomas y permaneciendo por un par de semanas más, aunque pueden tardar hasta seis meses en negativizarse. Esta prueba comúnmente se conoce como precipitina, debido a la habilidad del anticuerpo de formar un precipitado (15, 45).

En la actualidad, se utilizan tres técnicas principalmente para el diagnóstico serológico: inmunoensayos enzimáticos (EIAs), inmunodifusión (ID) y fijación del complemento (FC) (43).

Los EIAs en la actualidad son los más versátiles, y que presentan una mayor sensibilidad, ya que detectan en su mayoría, tanto IgG como IgM, pero a pesar de esto, no es una técnica tan específica, por lo que es necesario confirmar los resultados positivos en caso de IgM por ID o FC, si los resultados no son compatibles con la clínica del paciente. Las pruebas de ID presentan una buena respuesta aproximadamente al mismo tiempo que los EIAs se positivizan y en la actualidad existen pruebas que detectan ambos tipos de anticuerpos (43).

La fijación de complemento esta basada en la detección de anticuerpos tardíos (IgG), haciéndose positiva aproximadamente a los tres meses luego del apareamiento de los síntomas. A pesar de haber sido descrita desde 1950, sigue siendo de gran utilidad para el diagnóstico. En formas severas de coccidioidomicosis, el incremento del título es directamente proporcional a la actividad patógena del hongo. El título también sirve para monitoreo del paciente y determinar la efectividad de la terapia antifúngica (43, 45).

4. Identificación molecular

En la actualidad, no existen pruebas moleculares a nivel comercial, para la identificación de *Coccidioides* spp. a partir de muestras clínicas. Los diferentes kits a nivel comercial con los que se cuenta en la actualidad son para la identificación definitiva a partir de cultivo. La prueba ACCUPROBE (GenProbe, San Diego, C.A, USA) es una prueba rápida de DNA basada en la hibridización, se considera como el método de elección para la identificación definitiva de cultivos presuntivos de *Coccidioides* spp. Lastimosamente, esta prueba no permite la diferenciación entre las dos especies del género (43,46).

Binnicker y colabores han descrito un método utilizando reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR), para detectar el organismo a partir de muestras clínicas. Se evaluó su eficiencia en secreciones respiratorias, muestras tisulares en fresco y fijadas en parafina, obteniendo una sensibilidad global de 100% y especificidad de 98.4%, pero todavía no se encuentran disponibles a nivel comercial (47).

Asimismo, se han descrito los primeros cebadores para poder realizar amplificación por PCR para permitir la diferenciación de las especies por este método, pero no se encuentran disponibles a nivel comercial y solamente se han utilizado a nivel de investigación. Por otra parte, estos cebadores, desarrollados por Umeyama y colaboradores, solo han sido probados en un número limitado de cepas que no corresponden a la diversidad geográfica del hongo y no han sido validados en ningún otro estudio. En la actualidad la única metodología comprobada para la diferenciación entre ambas especies es

la utilización de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (48, 49).

5. Aislamiento y cultivo

El cultivo y aislamiento del organismo causal sigue siendo el estándar de oro para la identificación. A pesar de esto, la recuperación del organismo a partir de la muestra clínica es complicada y depende de la presentación clínica al momento de la toma de muestra y de la calidad de la muestra tomada (49).

Coccidioides spp puede crecer en la mayor parte de medios de cultivo para hongos, selectivos y no selectivos, como agar infusión cerebro-corazón (BHI), agar papa dextrosa (PDA), agar Sabouraud suplementado o no con cicloheximida. Además puede crecer en otros agares específicos para otros organismos, como agares especializados para aislamiento de *Legionella* (agar carbón-extracto de levadura) y para *Bordetella* (agar Bordet-Gengou y agar Regan-Lowe) (43, 49).

Al momento de la inoculación, debe de tomarse en cuenta el tipo de muestra a inocular. Muestras provenientes de sitios estériles, pueden inocularse en prácticamente cualquier medio de cultivo. En cambio, las muestras provenientes de sitios no estériles, debido a la presencia de bacterias y hongos saprobios que presentan una mayor tasa de crecimiento que *Coccidioides* spp, deben de ser inoculados en medios suplementados con antibióticos, como cloranfenicol, gentamicina, estreptomina y penicilina. Asimismo se suplementa con antifúngicos como el cicloheximida, para inhibir el crecimiento de hongos saprobios (49).

Luego de la inoculación de la muestra, se pueden empezar a encontrar colonias a partir de 4 o 5 días, variando entre 2 y 16 días. Las colonias jóvenes (entre 2 o 3 días), son color gris, membranosas y de difícil reconocimiento. En colonias de 4 a 5 días, las colonias son de apariencia algodonosa y color blanco característico. Estas colonias son la fase miceliar del hongo y pueden ser observados en una preparación con tinción de azul de lactofenol. En la misma, se pueden observar hifas delgadas, hialinas y septadas, se pueden observar artroconidios con apariencia de barril (de 3-4 x 3-6 μm), alternados por células disyuntivas. (43, 49).

6. Identificación

La identificación de *Coccidioides* spp. se basa tanto en las características fenotípicas y genotípicas del hongo. A partir de los cultivos con presencia de artroconidios, pueden tomarse como presuntivos, para realizar las pruebas de identificación (43).

A nivel de cultivo, debe de realizarse la conversión a fase infectiva, inoculando la fase miceliar en agar BHI. Otros hongos que pueden presentar artroconidios alternados con morfología similar son los géneros *Malbranchea*, *Chrysosporium*, *Geomyces* y *Sprotrichum pruinosum*. Solamente *Coccidioides* spp. es térmicamente dimórfico, por lo que la incubación a 37°C permite la identificación de este género (1, 49).

La diferenciación entre ambas especies del género no se realiza de rutina en la actualidad. Esto es, en parte debido a que aun no se conocen diferencias en presentación clínica o resistencia antifúngica entre ambas especies, por lo que se considera innecesaria la diferenciación (43).

Existen diferencias significativas en la velocidad de crecimiento miceliar en cultivo con concentraciones ascendentes de cloruro de sodio, donde a mayor concentración de cloruro de sodio, *C.posadasii* crece más lentamente que *C.immitis*(3,30).

Se ha descrito también que existen diferencias significativas con respecto a la termotolerancia entre las especies en su fase miceliar, donde a 37°C *C.posadasii* crece más rápidamente que *C.immitis*. A partir de esta diferencia, Barker y colaboradores han elaborado un modelo predictivo que permite la diferenciación de las especies por medio de la medición de los diámetros de crecimiento miceliar, aún sin la necesidad de una cepa control (8, 32).

H. Tratamiento

Es importante tomar en cuenta que debe de individualizarse el tratamiento para cada caso, principalmente debido a las diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad. En casos leves, benignos y autolimitados, solamente se recomienda reposo y medicamentos para tratar los síntomas, como analgésicos, antipiréticos y antitusivos (15).

A partir de la introducción de los antifúngicos azoles, estos se han convertido en la primera línea para este tipo de infecciones. Entre estos, se utilizan principalmente ketoconazol, fluconazol e itraconazol, tomando en cuenta que este último debe de monitorearse para comprobar una absorción adecuada. La ventaja que presentan los azoles es la facilidad de administración, ya que se administran por vía oral y la baja tasa de efectos adversos que estos presentan (51, 52).

En casos más complicados o agresivos, se prefiere la anfotericina B. Esta debe ser administrada por vía intravenosa y en esto radica su mayor ventaja, debido a la rápida absorción. A pesar de esto, tiene una amplia cantidad de efectos adversos, como nefrotoxicidad, hipoxia e hiper/hipotensión, por lo que debe de valorarse si no existe otra opción terapéutica previo a la administración de esta droga. En la actualidad, la anfotericina B-deoxicolato es la preparación de elección y puede ser administrada de manera intravenosa, intratecal, intralesión o intraauricular. Debido a la eficacia de los azoles, el uso de la anfotericina B se ha reducido principalmente en casos de enfermedad diseminada de rápida progresión, en mujeres embarazadas debido a la contraindicación de los azoles en el embarazo, infecciones osteoarticulares y de tejidos blandos, donde continua presentando un adecuado balance costo/beneficio (43, 53).

En la actualidad se continúan investigando nuevos antifúngicos que puedan tener un efecto sobre *Coccidioides* spp. En fase de desarrollo se encuentran el voriconazol y caspofungina, pero aun no se han aprobado para su uso en la coccidioidomicosis en humanos. Ambos han presentado una adecuada respuesta en modelos animales, pero aún no se han probado en infecciones en humanos a excepción de casos aislados. Por otro lado, la utilización de antibióticos de primera línea contra *Mycobacterium tuberculosis*, como rifampicina, isoniacida y etambutol; se ha propuesto como una posible línea de tratamiento para la coccidioidomicosis, pero por el momento estos estudios aún se encuentran en fase *in vitro* y aún no han sido probados en modelos animales, pero los resultados preliminares son prometedores (51, 54).

IV. Justificación

En el país todos los aislamientos de casos confirmados de coccidioidomicosis se han atribuido a *C. immitis*. Sin embargo, en la actualidad se debe considerar la posibilidad que *C. posadasii* sea el agente causal de la enfermedad, debido a la situación geográfica donde se encuentra el país, dado que dicha especie ahora es considerada el único agente causal de coccidioidomicosis en centro y sur de México y Brasil (30).

A pesar de que en la actualidad aún no se han encontrado diferencias en tratamiento o presentación clínica entre las especies del género, se han descrito que existen diferencias entre la virulencia y dosis infectiva entre las especies del género (7).

Además se han descrito dos diferencias fenotípicas entre las especies, como lo son las diferencias en halotolerancia y termotolerancia; lo cual es indicativo que cada especie tiene facultades diferentes para adaptarse a su hábitat, ya sea a nivel ecológico o a nivel patogénico (2,8).

En la actualidad, ambas especies pueden ser diferenciadas genotípicamente por medio de RFLP y secuenciación, pero ambas técnicas son de difícil acceso y elevado costo en el país. Por tal razón, la diferenciación por pruebas fenotípicas es de suma utilidad, ya que puede ser implementada fácilmente en los laboratorios de diagnóstico a nivel nacional.

Con este estudio, se identificara de forma preliminar la especie causal de coccidioidomicosis en el país, con lo que se sentaran las bases para futuros estudios donde se reconfirme la especie identificada en este estudio, para luego determinar la significancia clínica y epidemiológica de este hallazgo.

V. Objetivos

A. General

Caracterizar preliminarmente las especies de *Coccidioides* spp provenientes de aislamientos clínicos por medio de la halotolerancia y termotolerancia *in vitro*.

B. Específicos

1. Identificar las especies de *Coccidioides* por medio de la halotolerancia, medida a través de la cuantificación del diámetro de las colonias en medio YEG a concentraciones de 0.068 M, 0.102 M y 0.136 M de cloruro de sodio, a 30° C de temperatura de incubación.
2. Identificar las especies de *Coccidioides* por medio de termotolerancia, a través de la cuantificación del diámetro de crecimiento miceliar de las colonia en medio YEG a 37°C.

VI. Hipótesis

El 100% de los aislamientos clínicos evaluados corresponden a la especie *Coccidioides posadasii*.

VI. Materiales y Métodos

A. Universo

El estudio se realizó con cinco aislamientos de *Coccidioides* spp. provenientes del Cepario del Servicio de Micología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. No se realizó un muestreo, ya que se trabajó con la totalidad de cepas del universo del estudio.

Se consultó otros laboratorios de diagnóstico micológico (Hospital Roosevelt, Hospital General San Juan de Dios, Hospital Nacional de Zacapa, Instituto Guatemalteco de Seguridad Social), sin embargo ninguno de ellos tenía aislamientos disponibles o no fue posible acceder a los mismos.

B. Muestra

1. Muestra: Todas las cepas provenientes del universo descrito anteriormente.
2. Cepas:
 - c.1.12.82
 - c.1.10.91
 - c.1.11.91
 - c.1.12.91
 - c.1.14.94

Para detalles de las cepas, consultar anexo 3.

3. Cepa control *C. posadasii*: c.1.01.w (Universidad Autónoma de México)

C. Recursos

1. Recursos Humanos

- Investigador: Ricardo Mendizábal Burastero
- Asesor: Lic. Osberth Morales

2. Recursos Institucionales

- Servicio de Micología, Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

D. Materiales

1. Equipo

- Cabina de seguridad biológica tipo II clase A1 o A2
- Incubadora
- Microscopio
- Autoclave
- Balanza semianalítica
- Estufa
- Luminómetro LEADER, marca Gen-probe
- Baño maría con agitación sónica
- Baño maría

2. Reactivos

- Agar puro y exento de inhibidores para microbiología
- Agar Sabouroud
- Extracto de levadura
- Glucosa
- Cloruro de sodio
- Azul de lactofenol
- Kit de reactivos Accuprobe (Gen-probe) para identificación de *Coccidioides* spp. a partir de cultivos.
- Reactivo para luminómetro Gen-probe.
- Fenol al 5%

3. Cristalería

- Tubos de vidrio con tapón de rosca de bakelita de 16 x 175 mm
- Erlenmeyer de 250, 500, 1000 mL
- Beakers de 1000 mL
- Probetas
- Pipetas volumétricas
- Cajas de Petri
- Láminas portaobjetos

4. Otros

- Asas
- Pipetas Pasteur

- Pipeta automática con volumen variable, de 100-1000 μL
- Puntas descartables estériles, libres de RNAasas y DNAasas, para uso en biología molecular, de 100-1000 μL
- Mascarillas N95
- Batas
- Guantes descartables sin talco
- Cofias
- Lentes de seguridad
- Papel Parafilm
- Papel kraft
- Papel parafinado
- Papel mayordomo
- Algodón

E. Procedimientos

- Se revitalizó la cepa a partir de cultivo conservado en aceite mineral, sembrándola en medio Sabouraud, por dos semanas, a 26°C de temperatura de incubación, en tubo con tapón de rosca. Se sellaron los tubos y se cubrieron con papel parafilm.
- Se realizó una identificación molecular de todos los aislamientos disponibles para el estudio, para confirmar que correspondían a *Coccidioides* spp. Todas las cepas utilizadas en el estudio habían sido confirmadas previamente por el medio de microscopía e interconversion a fase parasítica, por lo que la identificación

molecular constituyó un complemento a dicha identificación. Las cepas que no correspondían a este género, fueron descartadas para el estudio.

1. Identificación molecular de cepas por medio de sondas Accuprobe

- Se etiquetaron los tubos de lisis, uno para cada cepa, además de un control positivo y un control negativo. Como control positivo se utilizó la cepa control c.1.1.w y como control negativo una cepa de *Histoplasma capsulatum*.
- Se pipetearon 100 µL de reactivo de lisis y 100 µL de buffer de hibridización en cada tubo.
- Se tomó una asada del cultivo, y se agitó en el interior de tubo correspondiente, para disolver la muestra.
- Se tapó cada tubo y mezcló 10 segundos en vortex.
- Se colocaron todos los tubos en una gradilla, y fueron colocados en baño maría con agitación sónica, a 60° C, durante 15 minutos.
- Se colocaron los tubos en baño maría, a 90° C, durante 10 minutos.
- Se removió la gradilla de tubos del baño maría, teniendo especial cuidado para no sufrir quemaduras.
- Se etiquetaron los tubos de reactivo de sonda.
- Se pipetearon 100 µL de muestra lisada en cada tubo de reactivo de sonda.
- Se adicionaron 300 µL de reactivo de selección a cada tubo.
- Se tapó cada tubo y agitó en vortex durante 10 segundos
- Se incubó en baño maría por 5 minutos a 60° C.

- Se removieron los tubos de baño maría y se dejó atemperar por 5 minutos. Posteriormente, se retiraron los tapones de cada tubo.
- Se seleccionó en el luminómetro, las características de prueba para *Coccidioides* spp.
- Se limpió con una toalla húmeda, el exterior de cada tubo.
- Se colocó en el luminómetro y se realizó la lectura, anotando el resultado.
- Se taparon los tubos y se descartó el material en desechos bioinfecciosos.
- Las muestras con resultado mayor a 50,000 RLU (unidades relativas de luminosidad) se consideraron como *Coccidioides* spp.

Fuente: Accuprobe *Coccidioides immitis* culture identification test. *Doc Tec*.

Disponible en: <http://www.gen-probe.com/pdfs/pi/102966RevF.pdf>

2. Determinación de halotolerancia

- Se preparó el medio de cultivo YEG (1% de glucosa, 1% de extracto de levadura y 1.5% de agar) con tres concentraciones de cloruro de sodio: 0.068 M, 0.102 M y 0.136 M.
- Se sirvió el medio fundido en cajas de Petrí, con un grosor de 2 mm, dejando enfriar y solidificar previo a su utilización.
- Se sembraron segmentos de 5 mm de diámetro de las cepas recuperadas, en los medios YEG con las diferentes concentraciones de cloruro de sodio, realizando 4 repeticiones por cada cepa. Se sellaron las cajas de Petrí con papel parafilm.
- Se incubaron en oscuridad a una temperatura de 30°C.
- Se midió el diámetro de crecimiento miceliar al día 15 de incubación.

- Se calculó la media del diámetro de crecimiento miceliar alcanzado en cada medio de cultivo, ingresando los datos en una base de datos en el programa SPSS 16.0
- Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre el diámetro de crecimiento de las colonias y la cepa control de *C. posadasii*.

3. Determinación de termotolerancia

- Se preparó el medio de cultivo YEG (1% de glucosa, 1% de extracto de levadura y 1.5% de agar) con tres concentraciones de cloruro de sodio: 0.068 M, 0.102 M y 0.136 M.
- Se sirvió el medio fundido en cajas de Petrí, con un grosor de 2 mm, dejando enfriar y solidificar previo a su utilización.
- Se sembraron segmentos de 5 mm de diámetro de las cepas recuperadas, en los medios YEG, realizando 4 repeticiones por cada cepa. Se sellaron las cajas de Petrí con papel parafilm.
- Se incubó en oscuridad a una temperatura de 37°C.
- Se midió el diámetro de crecimiento miceliar desde el día 10 al día 15 de incubación.
- El diámetro de crecimiento miceliar se operara en el modelo predictivo descrito por Barker y colaboradores (ver detalles en diseño experimental)
- El resultado de probabilidad obtenido para cada cepa se comparara con la tabla de probabilidades (anexo 4) para identificar a la especie.

4. Bioseguridad

Todo el manejo de las muestras, debido a las condiciones de patogenicidad del hongo, correspondió al nivel 2 de bioseguridad, de acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (50). Los lineamientos completos se describen en el anexo 5. Las consideraciones especiales son las siguientes:

- Se utilizó una cabina de bioseguridad de flujo laminar clase II, clase A2.
- Al momento de la manipulación las muestras, se utilizó mascarilla N95, así como doble guante.
- La bata externa fué esterilizada luego del proceso, al igual que los guantes previo a ser descartados.
- Todo el material utilizado en el proceso previo a ser autoclaveado (batas, guantes, mascarilla, cofia, etc.) fué colocado en bolsas de papel selladas, previo a ser retirado del área de trabajo.
- Se utilizó fenol al 5% para la desinfección de la cabina de bioseguridad.
- Todos los cultivos fueron sellados con papel parafilm, y colocados, debidamente etiquetados, en la incubadora.

F. Diseño Experimental

1. Análisis de datos para determinar halotolerancia:

- Se realizó análisis de varianza de una vía no paramétrica, por la prueba de Kruskal-Wallis, para observar diferencia estadísticamente significativa del diámetro de crecimiento de las colonias con respecto a la cepa estándar de *C. posadasii*, a concentraciones en aumento de cloruro de sodio. Si no existía diferencia

significativa entre la cepa evaluada y la cepa control de *C. posadasii*, el aislamiento correspondería a *C. posadasii*.

- Se realizaron 4 réplicas de cada cepa en cada condición evaluada.

2. Análisis de datos para determinar termotolerancia

- Se aplicó el modelo predictivo elaborado por Barker y colaboradores (8):

$$P(C. immitis) : 1 / (1 + \text{EXP}(-7.5773757 - (4.19174 * CR/D))) , \text{ donde,}$$

- CR: diámetro de crecimiento radial en milímetros
 - D: Numero de días (mínimo de 5 días)
 - P: Probabilidad que la cepa evaluada sea *C.immitis*
- El resultado de probabilidad calculado se comparó con la tabla de valores predictivos (anexo 4) y si este valor se encontraba dentro del intervalo de confianza, con un 95% de certeza se puede afirmar que la especie correspondía a *C. immitis*, en caso contrario la especie correspondía a *C. posadasii*.

VII. Resultados

Para realizar la identificación molecular se utilizó la prueba Accuprobe, con la cual se confirmó que las cepas evaluadas en este estudio correspondían a *Coccidioides* spp. Como se observa en la tabla 1, todas las muestras presentaron una luminosidad mayor a 50,000 RLU; lo cual se interpreta de acuerdo al método como un resultado positivo para *Coccidioides*. Basado en este resultado, todas las cepas fueron utilizadas como parte del estudio para poder evaluar su respuesta fenotípica en las condiciones evaluadas.

Tabla 1: Identificación de género por medio de Accuprobe

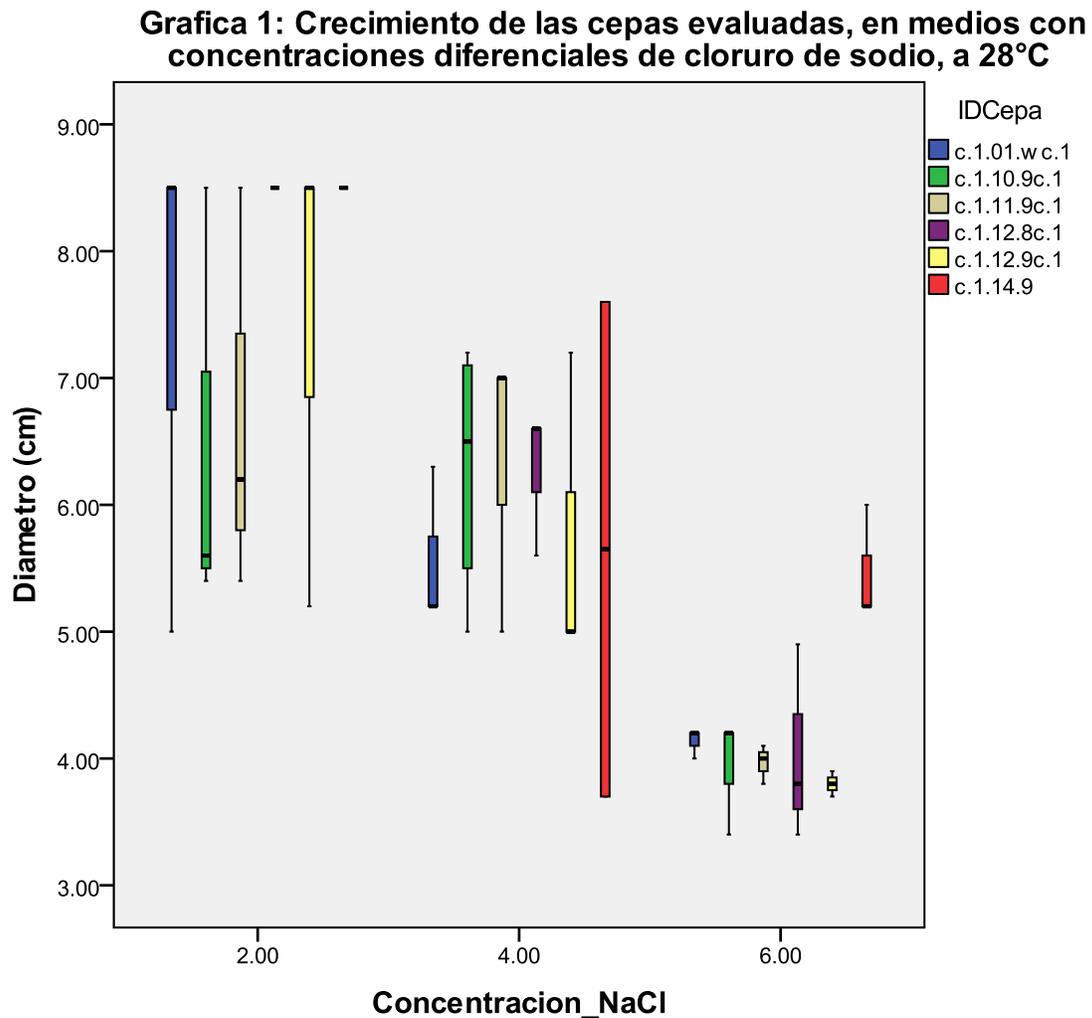
Cepa	Promedio de lectura (RLU)	Resultado
c.1.12.82	744443	Positivo
c.1.10.90 (A. Corzantes)	730575	Positivo
c.1.11.91	100688	Positivo
c.1.12.92	570453	Positivo
c.1.14.94	125941	Positivo
Control Positivo (c.1.01.w)	730084	Positivo
Control Negativo (<i>Histoplasma capsultum</i>)	4026	Negativo

*Fuente: Datos experimentales

Con respecto a la determinación de la halotolerancia de las cepas de *Coccidioides* spp, se encontró que todas las cepas mostraron la capacidad de crecer en el medio sin importar las concentraciones de cloruro de sodio. Sin embargo, el diámetro de las colonias disminuyó conforme aumentó la concentración de cloruro de sodio (grafica 1). A pesar que se observó diferencias del diámetro de las colonias en cada medio, no se encontró diferencia significativa de las cepas (ver anexo 6) en las tres concentraciones evaluadas,

con respecto a la cepa control (2% NaCl $p=0.220$; 4% NaCl $p=0.102$ y 6% NaCl $p=0.051$).

Con respecto a la reproducibilidad, se observó en algunas cepas una variabilidad entre las repeticiones, la cual fue más evidente en la cepa c.1.14.94 a 4% de cloruro de sodio. Sin embargo, a la concentración de 6% de cloruro de sodio, la variabilidad fue menor, obteniéndose una mayor reproducibilidad de las repeticiones.



En relación a la termotolerancia, por medio del modelo predictivo de Barker y colaboradores se demostró que la totalidad de las cepas evaluadas corresponden a la especie *C. posadasii*. La lectura fue realizada al día 12, debido a que ese fue el punto de corte ya que algunas de las colonias ya habían crecido en la totalidad del medio de cultivo.

Tabla 2: Evaluación de crecimiento miceliar en medio YEG a 37°C

Identificador de la cepa	Diámetro	Días de incubación	Probabilidad	Resultado
c.1.12.82	67 mm	12 días	1.43E-09	<i>C.posadasii</i>
c.1.10.90 (A. Corzantes)	74 mm	12 días	1.78E-07	<i>C.posadasii</i>
c.1.11.91	66 mm	12 días	3.18E-08	<i>C.posadasii</i>
c.1.12.92	60 mm	12 días	4.69E-08	<i>C.posadasii</i>
c.1.14.94	80 mm	12 días	1.78E-04	<i>C.posadasii</i>
c.1.01.w	70 mm	12 días	1.58E-05	<i>C.posadasii</i>

*Fuente: Datos experimentales

VIII. Discusión de Resultados

En Guatemala todos los casos confirmados de coccidioidomicosis se han atribuido a *C. immitis*. Sin embargo, en la actualidad debiera considerarse la posibilidad que *C. posadasii* sea el agente causal de la enfermedad en el país, debido a su situación geográfica, ya que dicha especie ahora es considerada el único agente causal de coccidioidomicosis en centro y sur de México y Brasil, países que tiene como base estudios de identificación de la especie causal (30).

Por tal razón, en el presente estudio se caracterizaron preliminarmente los aislamientos clínicos identificados como *Coccidioides immitis* por medio de la halotolerancia y termotolerancia *in vitro*, estableciéndose que las cepas analizadas corresponden a la especie *C. posadasii*, con lo cual se comprobó la hipótesis planteada.

Previo a la identificación de la especie, se confirmó molecularmente que las cepas del estudio correspondían al género *Coccidioides*. Aunque las cepas ya habían sido identificadas al momento de su aislamiento como *C.immitis*, se descartó la posibilidad de que las cepas no estuvieran en cultivo axénico debido al tiempo, método y condiciones de aislamiento; por medio de la prueba Accuprobe, la cual confirmó que la totalidad de las cepas corresponden a *Coccidioides* spp. por lo que todas las cepas fueron utilizadas para la fase de identificación de género (46).

Las características fenotípicas que fueron evaluadas en el presente estudio, halotolerancia y termotolerancia, son características en donde se ha reportado diferencias significativas entre las dos especies del género (3, 8, 30).

Con respecto a la halotolerancia, se observó la reducción del diámetro de las colonias de las cepas conforme al aumento de la concentración de cloruro de sodio, lo cual es un comportamiento esperado para el género. El diámetro alcanzado por las cepas evaluadas en este estudio, fue similar a lo reportado para *C.posadasii* en cepas que provenían de Estados Unidos, México y Brasil (3,30). La excepción fue la cepa c.14.94, la cual presentó una mayor halotolerancia en la concentración de 6% de NaCl comparado con las demás cepas, sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa entre todas las cepas estudiadas comparadas con la cepa control. Este hecho demuestra que las cepas corresponden a *C.posadasii*.

Cabe destacar que, a diferencia de otros estudios, en esta investigación se observó que en las tres concentraciones de cloruro de sodio (2% de NaCl, p: 0.220; 4% de NaCl, p: 0.102; 6% de NaCl, p: 0.051) no existió diferencia significativa entre la cepa control y las cepas evaluadas. Esto difiere a lo reportado por Fisher y colaboradores, donde solo se observó diferencia significativa al 6% de NaCl. Sin embargo, los resultados no pueden generalizarse, debido a las que puede existir pequeñas diferencias fenotípicas dentro de la especie, con respecto al área geográfica de donde provienen los aislamientos (3, 30).

Además, se utilizó el modelo predictivo descrito por Barker y colaboradores, para identificar las cepas. Al respecto, se observó que la probabilidad de que las cepas evaluadas correspondan a *C.immitis* se encuentran fuera del intervalo de confianza planteado por el modelo, por lo que las cepas corresponden a *C. posadasii*. Cabe destacar que los aislamientos evaluados presentaron un buen crecimiento en fase saprobia a 37° C, lo cual no ocurre con *C.immitis*, cuyo crecimiento es inhibido a esta temperatura. Es importante

hacer énfasis que el diámetro de crecimiento es mayor al reportado por Barker y colaboradores, lo cual evidencia una mayor termotolerancia de estos aislamientos (8).

En resumen, al comparar los resultados de las pruebas, se confirmó que los aislamientos corresponden a *Coccidioides* spp. y a la especie *C.posadasii*. La presencia de esta especie en el país confirma lo planteado en diversos estudios, donde se ha establecido que la especie *C.posadasii* (conocido previamente como *C.immitis* var. no-CA) se encuentra desde la zona norte de México hasta el sur del continente, en tanto que *C.immitis* se distribuye en Estados Unidos y norte de México (2,3,13,23,30,32).

Por lo tanto, esta investigación representa el primer reporte preliminar de *C.posadasii* en el país, sin embargo, es necesario que las características fenotípicas y la especie reportada en este trabajo, sean confirmadas por medio de biología molecular (3,46).

IX. Conclusiones

1. No existió diferencia estadísticamente significativa entre las cepas estudiadas comparadas con la cepa control de *C. posadasii* con respecto a la halotolerancia, por lo que aislamientos estudiados corresponden a la especie *C. posadasii*.
2. La probabilidad de que las cepas evaluadas correspondan a *C.immitis* se encuentran fuera del intervalo de confianza planteado por el modelo de Barker y colaboradores, por lo que las cepas corresponden a *C. posadasii*
3. Por medio de ambas pruebas se obtuvo la identificación preliminar de los aislamientos del estudio como *C.posadasii*.

X. Recomendaciones

1. Es necesario comprobar los resultados del presente estudio por medio de pruebas de biología molecular, para confirmar que las diferencias fenotípicas reportadas en este estudio corresponden a diferencias genotípicas.
2. Se recomienda incorporar estas pruebas fenotípicas como parte de la identificación de nuevos aislamientos clínicos, para identificar preliminarmente las cepas circulantes, con fines epidemiológicos.
3. Se recomienda la creación de un cepario nacional de especímenes de hongos patógenos, no solo de este género, lo cual permitiría llevar a cabo diversos estudios con una muestra representativa.

XI. Referencias

1. Stevens D. Coccidioidomycosis. N Eng J Med 1995; 332: 1077-1082.
2. Fisher M. *et. al.* Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. Proc Natl Acad Sci 2001; 98: 4558-4562.
3. Fisher M. *et. al.* Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia 2002; 94: 73-84.
4. Mayorga R., Espinoza H. Coccidioidomycosis in Mexico and Central America. Mycopath Mycol Appl 1970; 41:13-23.
5. Mayorga, R. Coccidioidomycosis in Central America. Proc. 2nd Coccidioidomycosis Symp. University of Arizona Press Arizona, 1967. 450p. (p. 287-91).
6. Gómez O. Actualización epidemiológica sobre la intradermorreacción con coccidioidina en algunos municipios del Departamento de Zacapa. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 56 p.
7. Cox R. Magee M. Coccidioidomycosis: Host Response and Vaccine Development. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4): 803-839.

8. Barker, B. *et. al.* Thermotolerance differences between species of *Coccidioides* allow development of an assay for species delineation. *Mycologia*. (en impresión).
9. Arango M. Castañeda E. *Micosis Humanas; Procedimientos Diagnósticos Exámenes Directos*. 2da Ed. Colombia: Corporación de Investigaciones Biológicas. 2003. 204p. (p. 89-93).
10. Hirschmann J. The early history of Coccidioidomycosis: 1982-1945. *Clin Infec Dis* 2007; 44: 1202-1207.
11. Dickson E. “Valley Fever” of the San Joaquin Valley and Fungus *Coccidioides*. *Cal & West Med* 1937; 47(3): 151-155.
12. Koufopanou V. *et. al.* Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 5478-5482.
13. Tintelnot K. *et. al.* Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol* 2007; 45(2): 385-93.
14. Saubolle M, McKellar P, Sussland D. Epidemiological, clinical, and diagnostic aspects of Coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(1): 26-30.
15. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 2da Ed. México: McGraw Hill. 2003. 352 p. (p. 155-163).
16. Logemann H. *Manual Práctico de Micología Médica*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 1995. 227 p. (p. 102-108).

17. Kirkland T, Fierer J. Coccidioidomycosis: A reemerging infectious disease. *Emerg Infect Dis* 1996; 3(2): 192-199.
18. Ozuna K. Purificación de antígenos de *Coccidioides immitis* producidos localmente y su uso en la prueba de ELISA para el diagnóstico de coccidioidomicosis. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 84 p.
19. Hector R, Landiano-Laborin R. Coccidioidomycosis: A fungal disease of the Americas. *PLoS Med* 2005; 2(1):e2-e5.
20. Muñoz B. *et. al.* Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in Mexican patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1247-1249.
21. Yong Ke MD. *et. al.* Unusual forms of immature sporulating *Coccidioides immitis* diagnosed by fine-needle aspiration biopsy. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 97-100.
22. Burt A. *et. al.* Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 770-773.
23. Fraser J. *et. al.* Evolution of mating type locus: insights gained from the dimorphic primary fungal pathogens *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Eukar Cel* 2007; 6(4): 622-629.
24. Conde-Ferrández L. El locus *MAT* (mating type) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 95-99.

25. Lacy G, Swantek F. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at ameridian middens in California. *Appl Microbiol* 1974; 27(2): 379-388.
26. Mirdob-Donovan F. Urease production by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. *Infec Immun* 2006; 74(1): 504-515.
27. Fisher F. *et al.* *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States: A matter of scale. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:47-72.
28. Talamantes J, Behseta S, Zender C. Fluctuations in climate and incidence of coccidioidomycosis in Kern County, California: A review. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:73-82.
29. Landiano-Laborin R. Coccidioidomycosis, más que una enfermedad regional. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2006; 19(4): 301-308.
30. Cordeiro R *et al.* Phenotypic characterization and ecology features of *Coccidioides* spp. from Northeaest Brazil. *Med Mycol* 2006; 44:631-639.
31. Egenberg R, Elconin A, Egenberg M. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *J Bact* 1964; 88(2): 473-476.
32. Barker B. *et al.* Title. Thermotolerance differences between species of *Coccidioides* allow development of an assay for species delineation species. *Fung Gen News.* 2005; 52:57.

33. Landiano-Laborin R. Expanding understanding of epidemiology of Coccidioidomycosis in the Western Hemisphere. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:19-34.
34. Baptista R, Riquelme M. Epidemiología de la coccidioidomicosis en México. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 100-105.
35. Mondragón-Gonzalez R. *et al.* Detección de infección por *Coccidioides immitis* en zonas del estado de Coahuila, México. *Rev Arg Micro* 2005; 37:135-138.
36. Wanke B. *et al.* Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's Northeastern State of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathol* 1999; 148(2): 57-67.
37. Aviles-Salas A, Quintero-Cuadra Y, Cornejo-Juarez, P. Coccidioidomicosis extrapulmonar. Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Rev Chil Infectol* 2007; 24(5): 398-401.
38. Wright E, Winer L. The natural history of experimental primary-inoculation *Coccidioides immitis* infection. *Int Jour Dermat* 1970; 10(1): 17-23.
39. Wilson J, Smith C, Plunkett O. Primary cutaneous coccidioidomycosis: The criteria for diagnosis and a report of a case. *Cal Med* 1953; 79(3): 233-239.
40. Castañón L. *et al.* Coccidioidomicosis y su escaso conocimiento en nuestro país. *Rev Fac Med UNAM* 2004; 47(4): 145-148.

41. Arsura E, Kilgore W. Miliary Coccidioidomycosis in the immunocompetent. *Chest* 2000; 117: 404-409.
42. Smith C. *et al.* Human Coccidioidomycosis. *Bacteriol Rev* 1961; 25(3): 310-320.
43. Saubolle M. Laboratory aspects in the diagnosis of Coccidioidomycosis. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:301-314.
44. Wieden M, Saubolle, M. The histopathology of coccidioidomycosis. En: Einstein H y Catanzaro A(eds.), *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th international conference.* National Foundation for Infectious Diseases, Washington, DC.1996
45. Pappagianis D, Zimmer B. Serology of Coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(3): 247-268.
46. McGinnis M, Smith M, Hinson E. Use of the *Coccidioides posadasii* Δ chs5 strain for quality control in the ACCUPROBE culture identification test of *Coccidioides immitis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11): 4250-4251.
47. Binnicker M. *et al.* Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 45(1):173-178.
48. Umeyama T. *et al.* Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5): 1859-1862.
49. Barker, B. The Population Biology of Coccidioides: Epidemiologic Implications for Disease Outbreaks. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111: 147-163.

50. Sutton D. Diagnosis of Coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods and susceptibility testing. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:315-325.
51. Galgiani J. *et al.* Coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1217-1223.
52. Stevens D, Clemons, K. Azole therapy of clinical and experimental Coccidioidomycosis. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:442-454.
53. Johnson R, Einstein, H. Amphotericin B and Coccidioidomycosis. *Ann N.Y. Acad Sci* 2007; 1111:434-441.
54. Cordeiro R. *et. al.* *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. *J Antimicrobiol Chem* 2006; 58: 575-579.

XII. Anexos

Anexo 1: Nombres o Sinónimos de *Coccidioides* spp.

Especies del género:

Coccidioides posadasii M.C. Fisher, G.L. Koenig, T.J. White & J.W. Taylor, *Mycologia*

94(1): 78 (2002)

Coccidioides immitis G.W. Stiles, in Rixford & Gilchrist, *Rep. Johns Hopkins Hosp.* 1: 243 (1896)

Sinónimos:

Aleurisma immite (G.W. Stiles) Bogliolo & J.A. Neves, *Mycopathologia* 6: 147 (1952)

Blastomycoides immitis (G.W. Stiles) Castell., *Am. J. Trop. Med.* 8: 385 (1928)

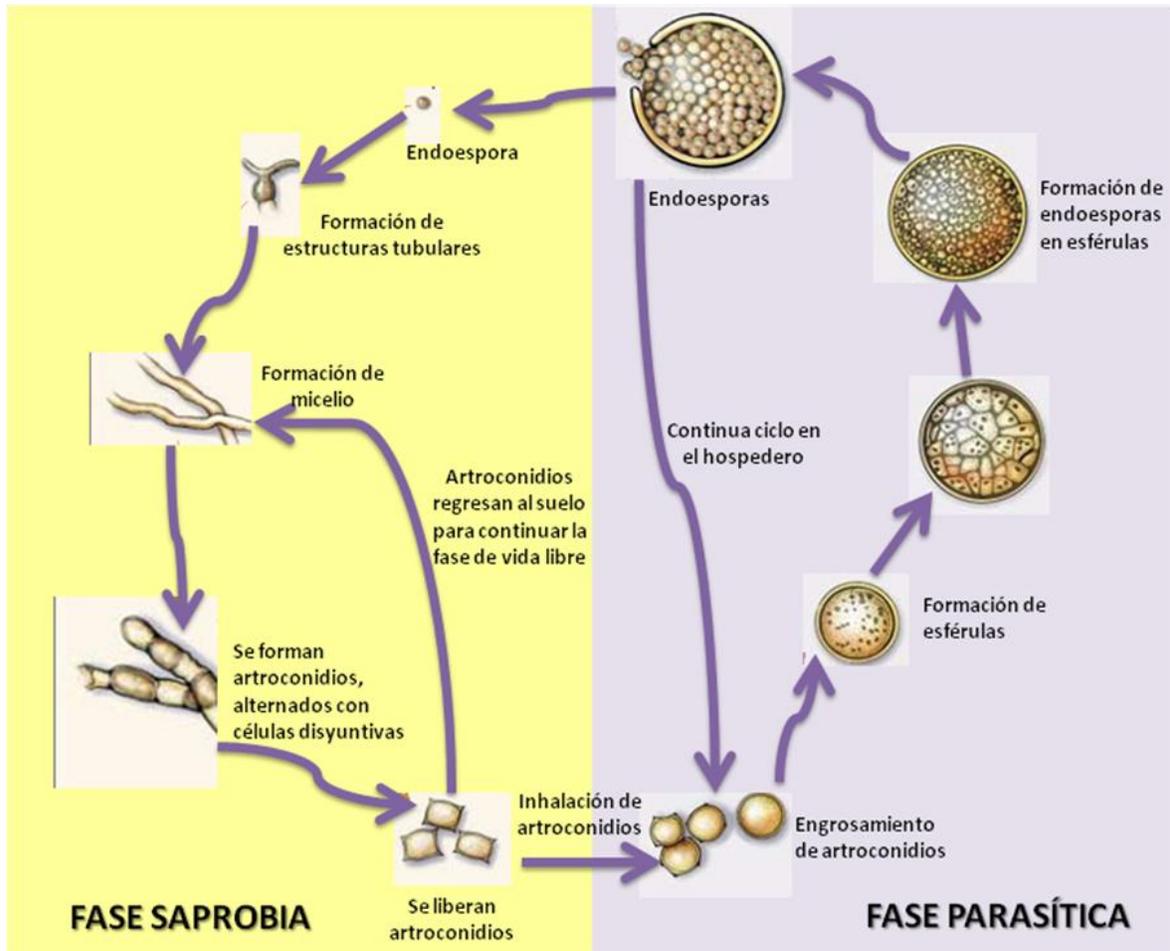
Geotrichum immite (G.W. Stiles) A. Agostini, *J. Trop. Med. Hyg.* 35: 266 (1932)

Zymonema immitis (G.W. Stiles) Mello

Fuente: Index Fungorum. Disponible en: [http://indexfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?](http://indexfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=416228)

RecordID=416228. Fecha de Consulta 10/06/09

Anexo 2: Ciclo de Vida de *Coccidioides* spp.



Adaptado de: Stevens D. Coccidioidomycosis. N Eng J Med 1995; 332: 1077-1082.

Anexo 3: Descripción de muestras del cepario

Identificador de la cepa	Sitio de aislamiento	Año	Procedencia
c.1.12.82	Pulmón	1982	Zacapa
c.1.10.90 (A. Corzantes)	Muñeca	1991	Ciudad de Guatemala
c.1.11.91	Muñeca	1991	ND
c.1.12.92	Medula Ósea	1991	ND
c.1.14.94	Lavado Bronquial	1994	ND
c.1.01.w	Cepa Control <i>C. posadasii</i>	NA	México

ND: No hay datos

NA: No aplica

Fuente: Cepario Servicio de Micología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Anexo 4: Valores predictivos de diámetro de crecimiento miceliar en medio YEG a 37°C.

Diametro (mm)	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
7	0.85(0.68-0.94)	0.94 (0.87-0.97)						
8	0.70 (0.44-0.88)	0.88 (0.74-0.95)	0.94 (0.88-0.97)					
9	0.51 (0.23-0.78)	0.78 (0.56-0.91)	0.90 (0.79-0.96)	0.95 (0.89-0.97)				
10	0.31 (0.10-0.64)	0.64 (0.36-0.85)	0.83 (0.65-0.93)	0.91 (0.81-0.96)				
11	0.16 (0.04-0.47)	0.47 (0.20-0.76)	0.73 (0.48-0.89)	0.86 (0.70-0.94)	0.92 (0.83-0.96)			
12	0.08 (0.02-0.31)	0.31 (0.10-0.64)	0.60 (0.31-0.83)	0.78 (0.56-0.91)	0.88 (0.74-0.95)	0.93 (0.85-0.97)		
13	0.03 (0.01-0.18)	0.18 (0.05-0.50)	0.45 (0.18-0.75)	0.68 (0.41-0.87)	0.82 (0.63-0.92)	0.89 (0.77-0.95)	0.93 (0.86-0.97)	0.95 (0.91-0.98)
14		0.10 (0.02-0.36)	0.31 (0.10-0.64)	0.56 (0.28-0.81)	0.74 (0.50-0.89)	0.85 (0.68-0.94)	0.90 (0.80-0.96)	0.94 (0.87-0.97)
15		0.05 (0.01-0.24)	0.20 (0.05-0.52)	0.43 (0.17-0.73)	0.64 (0.36-0.85)	0.78 (0.56-0.91)	0.87 (0.71-0.94)	0.91 (0.81-0.96)
16			0.12 (0.03-0.40)	0.31 (0.10-0.64)	0.53 (0.25-0.79)	0.70 (0.44-0.88)	0.81 (0.62-0.92)	0.88 (0.74-0.95)
17			0.07 (0.01-0.28)	0.21 (0.06-0.53)	0.42 (0.16-0.72)	0.61 (0.33-0.84)	0.75 (0.51-0.90)	0.84 (0.66-0.93)
18			0.04 (0.01-0.19)	0.14 (0.03-0.43)	0.31 (0.10-0.61)	0.51 (0.23-0.78)	0.76 (0.40-0.86)	0.78 (0.56-0.91)
19				0.08 (0.02-0.32)	0.22 (0.06-0.55)	0.40 (0.15-0.72)	0.58 (0.30-0.82)	0.72 (0.46-0.88)
20				0.05 (0.01-0.24)	0.15 (0.04-0.45)	0.31 (0.10-0.64)	0.49 (0.21-0.77)	0.64 (0.36-0.85)
21					0.10 (0.02-0.36)	0.23 (0.06-0.56)	0.40 (0.15-0.71)	0.56 (0.28-0.81)
22					0.06 (0.01-0.27)	0.16 (0.04-0.47)	0.31 (0.10-0.64)	0.47 (0.20-0.76)
23						0.11 (0.03-0.38)	0.23 (0.07-0.56)	0.39 (0.14-0.70)
24						0.08 (0.02-0.31)	0.17 (0.04-0.49)	0.31 (0.10-0.64)
25						0.05 (0.01-0.24)	0.12 (0.03-0.41)	0.24 (0.07-0.57)
26						0.03 (0.01-0.18)	0.09 (0.02-0.33)	0.18 (0.05-0.50)
27						0.02 (0.00-0.13)	0.06 (0.01-0.27)	0.14 (0.03-0.43)
28						0.02 (0.00-0.10)	0.04 (0.01-0.21)	0.10 (0.02-0.36)
29								0.07 (0.01-0.29)

* Valores predictivos con un 95% de confianza, que la especie medida corresponda a *C. immitis*.

Fuente: Barker, B. *et. al.* Thermotolerance differences between species of *Coccidioides* allow development of an assay for species delineation. *Mycologia*. (en impresión).

Anexo 5: Consideraciones para Nivel de Seguridad 2 (BSL-2)

El Nivel de Bioseguridad 2 es similar al Nivel de Bioseguridad 1 y es adecuado para trabajos que involucren agentes de riesgo potencial moderado para el personal y el medio ambiente. Difiere del BSL-1 en que (1) el personal del laboratorio cuenta con un capacitación específica en la manipulación de agentes patogénicos y está dirigido por científicos competentes; (2) el acceso al laboratorio es limitado cuando se están desarrollando actividades; (3) se toman precauciones extremas con elementos cortantes contaminados y (4) ciertos procedimientos que pueden generar aerosoles o gotitas infecciosas se llevan a cabo en gabinetes de seguridad biológica o en otros equipos de contención física.

Las siguientes prácticas especiales y estándar, los equipos de seguridad y las instalaciones se aplican a los agentes asignados al Nivel de Bioseguridad 2:

A. Prácticas Microbiológicas Estándar

1. El director del laboratorio limita o restringe el acceso al laboratorio cuando se están realizando experimentos.
2. Las personas se lavan las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio.
3. Todos los procedimientos se realizan con cuidado a fin de minimizar la generación de salpicaduras o aerosoles.

4. Las superficies de trabajo se descontaminan luego de finalizar el trabajo o al fin del día y luego de cada derrame o salpicadura de material viable con desinfectantes efectivos contra los agentes en cuestión.

5. Todos los cultivos, stocks y otros desechos reglamentados se descontaminan antes de ser desechados mediante un método de descontaminación aprobado, como por ejemplo, mediante autoclave. Los materiales que se descontaminarán fuera del laboratorio inmediato son colocados en un recipiente duradero, estanco y cerrado para su transporte desde el laboratorio. Los materiales que se deben descontaminar fuera de la instalación se embalan de conformidad con las normas aplicables locales, estatales y federales, antes de ser retirados de la instalación.

B. Prácticas Especiales

1. Se restringe el acceso al laboratorio cuando se están realizando trabajos con agentes infecciosos.

2. Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio cuando se están utilizando agentes etiológicos. La información adecuada que debe colocarse incluye el agente o agentes que se están utilizando, el nivel de bioseguridad, las inmunizaciones requeridas, el nombre del investigador y su número de teléfono, todo equipo de protección que deba utilizarse en el laboratorio y todos los procedimientos requeridos para retirarse del laboratorio.

3. Se incorporan los procedimientos de seguridad de los procedimientos operativos estándar o del manual de bioseguridad adoptado o preparado específicamente para el laboratorio por el director del laboratorio. Se le advierte al personal sobre los riesgos especiales y se le exige que lea y siga las instrucciones sobre prácticas y procedimientos.

4. El director del laboratorio debe garantizar que el personal de laboratorio y de asistencia o soporte reciba la capacitación adecuada sobre los posibles riesgos asociados con el trabajo en cuestión, las precauciones necesarias para evitar exposiciones y los procedimientos de evaluación de exposición. El personal recibe las actualizaciones anuales o instrucción adicional según sea necesario conforme a las modificaciones de procedimientos o políticas.

5. Los cultivos, tejidos, fluidos corporales, o desechos potencialmente infecciosos se colocan en un recipiente con tapa que evita las filtraciones durante la recolección, manejo, procesamiento, almacenamiento, transporte o envío.

6. Se descontaminan los equipos y las superficies de trabajo regularmente con un desinfectante efectivo después de trabajar con el agente infeccioso, y especialmente cuando se producen derrames evidentes, salpicaduras u otra contaminación por materiales infecciosos. Se deben descontaminar los equipos conforme a las normas federales, estatales y locales antes de enviarlos para su reparación o mantenimiento o embalarlos para transporte de conformidad con las reglamentaciones federales, estatales y locales de aplicación antes de retirarlos de las instalaciones.

7. Se deben informar de inmediato al director de la institución los derrames y accidentes que deriven en exposiciones evidentes a los materiales infecciosos. Se ofrece la evaluación, el control y tratamiento médico necesario y se guardan registros escritos.
8. No se permite la presencia en el laboratorio de animales que no se están utilizando en el trabajo que se está realizando.

C. Equipo de Seguridad (Barreras Primarias)

1. Se utilizan gabinetes biológicos mantenidos de manera adecuada, preferentemente de Clase II, u otros equipos de protección personal o dispositivos de contención física adecuados cuando:
 - a. Se realicen procedimientos que puedan generar aerosoles o salpicaduras infecciosas. Entre otros centrifugado, pulverizado, mezclado, agitación, sonicación, la apertura de recipientes de distintas a las presiones ambiente, inoculación intranasal de animales, y la cosecha de tejidos infectados de animales o huevos embrionarios.
 - b. Se utilicen altas concentraciones o grandes volúmenes de agentes infecciosos. Dichos materiales pueden centrifugarse en el laboratorio abierto si se emplean rotores sellados o cubetas de seguridad para centrífugas, y si estos rotores o cubetas de seguridad se abren sólo en un gabinete de seguridad biológica.
2. Se utiliza una protección facial (anteojos, máscaras, protecciones faciales u otra protección) para las probables salpicaduras o aerosoles de materiales

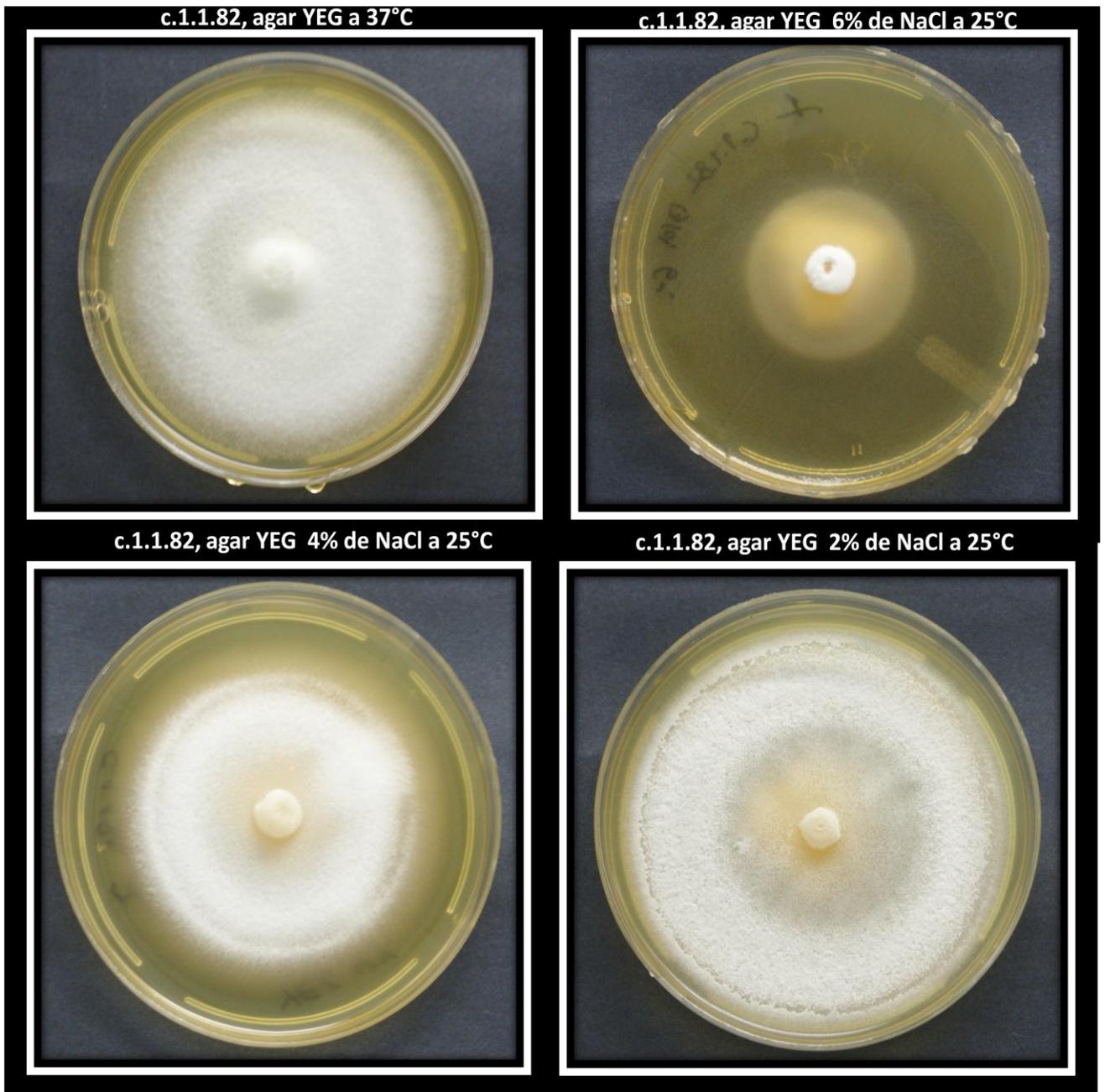
infecciosos u otros materiales peligrosos para el rostro cuando se deben manipular los microorganismos fuera del BSC.

3. Se deben usar ambos, delantales, batas cortas o uniformes de laboratorio de protección adecuados para el laboratorio durante la permanencia en el mismo. Se debe retirar y dejar esta ropa de protección en el laboratorio antes de dirigirse a otras áreas (por ejemplo, cafetería, biblioteca, oficinas administrativas). La institución desecha toda la ropa de protección en el laboratorio o se ocupa de lavarla; el personal no debe llevarla a su casa.

4. Se deben usar guantes cuando es posible que las manos entren en contacto con materiales infecciosos, superficies o equipos contaminados. Puede ser apropiado el uso de dos pares de guantes. Se descartan los guantes cuando están manifiestamente contaminados, y se retiran cuando se completa el trabajo con los materiales infecciosos o cuando está comprometida la integridad del guante. Los guantes descartables no se lavan, no se vuelven a usar ni se utilizan para tocar superficies “limpias” (teclados, teléfonos, entre otras), y no se deben usar fuera del laboratorio. Se debe contar con alternativas a los guantes de látex empolvados. Se deben higienizar las manos después de retirarse los guantes.

Fuente: Centro de Control y Prevención de Enfermedades -CDC-. Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomedicina. 5ta Edición. *Doc Tec*. 2007

Anexo 5: Crecimiento miceliar de colonias, al día 12 de medición



Anexo 6: Análisis de Varianza de una Vía para determinación de halotolerancia

Nota: Datos calculados utilizando MyStat Version 12.02.00.

Kruskal-Wallis One-way Analysis of Variance for 23 Cases (2% de NaCl)

The categorical values encountered during processing are

Variables	Levels				
DIAM (6 levels)	5.000	5.200	5.400	5.600	6.200
	8.500				
Dependent variable	CEPA				
Grouping variable	Diametro (cm)				
Group	Count	Rank Sum			
5	1	5.500			
5.2	1	17.500			
5.4	2	11.500			
5.6	1	2.000			
6.2	2	19.000			
8.5	16	220.500			

Kruskal-Wallis Test Statistic : 7.011

p-value is 0.220 assuming Chi-square Distribution with 5 df

Kruskal-Wallis One-way Analysis of Variance for 23 Cases (4% de NaCl)

The categorical values encountered during processing are

Variables	Levels				
NACL (1 levels)	4.000				
DIAM (10 levels)	3.700	5.000	5.200	5.600	6.000
	6.300	6.600	7.000	7.200	7.600
Dependent variable	CEPA				
Grouping variable	Diametro (cm)				
Group	Count	Rank Sum			
3.7	2	43.000			
5	5	65.000			
5.2	3	19.500			
5.6	1	13.500			
6	1	2.500			
6.3	1	6.500			
6.6	3	40.500			
7	3	22.500			
7.2	2	20.000			
7.6	2	43.000			

Kruskal-Wallis Test Statistic : 14.629

p-value is 0.102 assuming Chi-square Distribution with 9 df

Kruskal-Wallis One-way Analysis of Variance for 20 Cases (6% de NaCl)

The categorical values encountered during processing are

Variables	Levels				
NACL (1 levels)	6.000				
DIAM (10 levels)	3.000	3.200	3.400	3.800	4.000
	4.100	4.200	4.900	5.200	6.000
Dependent variable	CEPA				
Grouping variable	Diametro (cm)				
Group	Count	Rank Sum			
3	1	15.500			
3.2	3	46.500			
3.4	2	14.000			
3.8	2	20.500			
4	3	22.000			
4.1	1	8.500			
4.2	4	14.000			
4.9	1	12.000			
5.2	2	38.000			
6	1	19.000			

Kruskal-Wallis Test Statistic : 16.848

p-value is 0.051 assuming Chi-square Distribution with 9 df