**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**

# DESARROLLO DE UN MÉTODO POR AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE (LAMP) PARA DETECCIÓN DE *Coccidioides* spp.

---

Por:

**José María Gastélum Cano**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

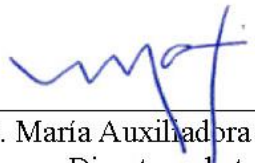
Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora. Julio 2021

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José María Gastélum Cano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Directora de tesis

Dr. Alfonso García Galaz
Integrante del comité de tesis

Dra. Carmen Arminda Contreras Vergara
Integrante del comité de tesis

Mitzuko Dautt C.

Dra. Mitzuko Dautt Castro
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Desarrollo de un Método por Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) para Detección de *Coccidioides* spp." es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor José María Gastélum Cano, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para el desarrollo y conclusión de mis estudios de posgrado, contribuyendo con la beca número 867190.

Al CIAD por acogerme como alumno de maestría tanto en las aulas, como en sus laboratorios para el desarrollo de mi proyecto de tesis. Gracias por hacerme crecer tanto en lo profesional como en lo personal, siempre estaré con la institución.

Quiero en primer lugar agradecer a la Dra. María Islas Osuna quien ha creído en mí y en este proyecto, cuyo potencial es infinito. Gracias por permitirme contribuir y hacerme parte de él, al grado de sentirlo mío. Le agradezco mucho la oportunidad de haberme permitido ingresar a la maestría y a su laboratorio, y de aprender de usted tanto en lo teórico como en lo práctico, así como la oportunidad de poder conocer a profesores de tal talla que sólo CIAD los tiene. Usted ha sido una gran jefa para mí y agradezco mucho los bocadillos en los días largos y difíciles. También valoro mucho sus consejos y paciencia. Confío en que habrá muchos más frutos de esta relación de trabajo y amistad, y que este proyecto será de gran aporte para la sociedad.

También me gustaría agradecer a la Dra. Carmen Contreras Vergara, quién ha estado al pie del cañón en el laboratorio, apoyándome en la parte experimental, enseñándome el uso de equipos y reactivos, y aportando sus invaluables sugerencias para el desarrollo de mis experimentos. Su presencia en el área de trabajo también hace más llevadero el trabajo y el proceso. Agradezco su gran disposición para apoyarme y las grandes enseñanzas que me ha dejado en la parte práctica.

Me gustaría extender un agradecimiento también a la Dra. Mitzuko Dautt Castro y al Dr. Alfonso García Galaz por sus valiosas sugerencias en la planeación de mis experimentos y por enseñarme cómo debe ser el abordaje y la resolución de problemas experimentales. Agradezco también su activa participación y su pronta atención para con este proyecto, sobre todo en etapa de pandemia, que sin duda sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Gracias a la Dra. Mitzuko por sus valiosas observaciones y aportaciones en la redacción de nuestro artículo de revisión y en esta tesis. Gracias particularmente al Dr. Alfonso por sus enseñanzas en el salón de clase que sin duda me serán de mucha utilidad en el futuro y por la atención que tuvo para conmigo en la gran cantidad de consultas que le hicimos para estos experimentos. También agradezco a la Dra. Diana Evelyn

Villa Guillén por su colaboración en este proyecto como Asesor académico extendido. En general, agradezco a mi comité de tesis por hacer de este un proyecto posible y de gran calidad. Espero poder tener el honor de seguir trabajando con ustedes en el futuro.

Quiero agradecer a Andrea Gil, mi compañera de laboratorio con quién he entablado una sincera amistad y quién siempre tiene sugerencias muy útiles y palabras de ánimo que siempre me regresan a la vida. Gracias a mi buen amigo Alejandro Tiznado por la ayuda desinteresada y por su amistad tanto en las aulas como en el exterior. Me gustaría agradecer Adelmo Rosas, José Teutle, Alejandro León y Carlos Coronado, por hacer de la maestría una grata experiencia de amistad y por permitirme aprender de ellos. Quiero agradecer a María Robinson por las largas pláticas, las risas, los buenos momentos y su apoyo incondicional en esta etapa. Para todos los que llenaron mi vida en esta etapa y para los que hicieron la pandemia más llevadera, gracias totales.

## DEDICATORIA

Con cariño para mi hermano Saul, donde quiera que te encuentres…

A mis padres, la razón y el motor por el cual he llegado hasta donde estoy. Sin quienes nada de esto sería posible.

A mi prometida Evelyn, con mucho amor. Gracias por escucharme y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis amigos y compañeros del CIAD, con quienes he entablado muy buenas relaciones y he conocido gente maravillosa.

Para todos ellos, con cariño esta tesis.

"Y supe que yo andaba queriendo querencia, y que había llegado la hora del fin del exilio. Después de mucha mar, nada el salmón en busca de su río, y lo encuentra y lo remonta, guiado por el olor de las aguas, hasta el arroyo de su origen." (Eduardo Galeano)

**CONTENIDO**


**APROBACIÓN**..... 2
**DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**..... 3
**AGRADECIMIENTOS**..... 4
**DEDICATORIA**..... 6
**CONTENIDO**..... 7
**LISTA DE FIGURAS**..... 9
**LISTA DE CUADROS**..... 11
**RESUMEN**..... 12
**ABSTRACT**..... 13
**1. INTRODUCCIÓN**..... 14
**2. ANTECEDENTES** ..... 16
2.1. Coccidioidomicosis..... 16
2.1.1. Aspectos Clínicos..... 16
2.1.2. Biología de *Coccidioides* spp..... 17
2.1.3. Patogénesis..... 18
2.1.4. Epidemiología..... 19
2.2. Diagnóstico de Coccidioidomicosis..... 20
2.2.1. Detección de *Coccidioides* spp. por Laboratorio Clínico..... 22
2.2.2. Métodos Moleculares..... 23
2.3. Genómica de *Coccidioides* spp. ..... 24
2.3.1. Genes Potencialmente Útiles para Diagnóstico Molecular..... 25
2.3.2. Regiones ITS como Blancos Moleculares..... 26
2.4. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)..... 27
2.4.1. Fundamento..... 27
2.4.2. Ventajas del Método LAMP como Prueba Molecular..... 28
**3. HIPÓTESIS**..... 29
**4. OBJETIVOS**..... 30
4.1. Objetivo General..... 30
4.2. Objetivos Particulares..... 30
**5. MATERIALES Y MÉTODOS**..... 31
5.1. Tipo de Estudio..... 31
5.2. Desarrollo del Ensayo LAMP..... 31
5.2.1. Diseño del Control Positivo..... 31
5.2.2. Diseño de Iniciadores para la Amplificación Isotérmica..... 32
5.2.3. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)..... 32
5.2.4. Validación de Iniciadores para LAMP..... 34

**CONTENIDO (continuación)**


5.2.5. Determinación de Condiciones Óptimas para Amplificación Isotérmica……. 35

**6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**…….…….. 40
6.1. Diseño de Iniciadores para Amplificación Isotérmica……..... 40
6.2. Diseño, Clonación y Aislamiento de Control Positivo para LAMP……..... 41
6.3. Comprobación de Funcionalidad de Iniciadores para Amplificación Isotérmica……..... 43
6.4. Determinación de Condiciones Óptimas de Reacción……. 49
6.4.1. Determinación de Concentración Óptima de Iniciadores Internos (FIP/BIP)…… 50
6.4.2. Determinación de Dilución Óptima de SYBR® Green I…….. 52
6.4.3. Determinación de Tiempo de Reacción Óptimo…….. 54
6.4.4. Determinación de Temperatura de Reacción Óptima……... 56
6.4.5. Pruebas con Condiciones Intermedias de Temperatura y Tiempo……..... 58

**7. CONCLUSIONES**…… 65

**8. REFERENCIAS**……..... 67

## LISTA DE FIGURAS


| Figura | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Selección de colonias transformadas en medio LB con ampicilina…….. | 42 |
| 2 | Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la región amplificada mediante PCR de 4 colonias seleccionadas (carriles 1 al 4)……..…….. | 42 |
| 3 | Reacciones LAMP reveladas con SYBR Green 20X (Panel inicial 1)…….….. | 44 |
| 4 | Reacciones LAMP reveladas con SYBR® Green 20X (Panel inicial 2)…...….. | 44 |
| 5 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel inicial) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 44 |
| 6 | Viales de reacción LAMP con un solo iniciador (Panel A). Tinción con SYBR® Green 20X……..... | 45 |
| 7 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel A) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 46 |
| 8 | Viales de reacción LAMP con mezcla de iniciadores (Panel B). Tinción con SYBR® Green 20X……..... | 47 |
| 9 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel B) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 48 |
| 10 | Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel C)…….. | 50 |
| 11 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel C) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 51 |
| 12 | Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel D)…….. | 51 |
| 13 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel D) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 52 |
| 14 | Viales de reacción LAMP para determinación de dilución óptima de SYBR® Green I (Panel E)…….. | 53 |
| 15 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel E) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 53 |
| 16 | Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel F)……..... | 55 |
| 17 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel F) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 56 |
| 18 | Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel G)…….. | 57 |

## LISTA DE FIGURAS (continuación)


| | | |
|---|---|---|
| 19 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel G) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 57 |
| 20 | Viales de reacción LAMP para pruebas de condiciones intermedias entre variables temperatura y tiempo de reacción (Panel H-1)……..... | 59 |
| 21 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel H-1) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 59 |
| 22 | Viales de reacción LAMP para pruebas de condiciones intermedias entre variables temperatura y tiempo de reacción (Panel H-2)……..... | 60 |
| 23 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel H-2) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 60 |
| 24 | Viales de reacción LAMP para pruebas de condiciones intermedias entre variables temperatura y tiempo de reacción (Panel H-3)…… | 61 |
| 25 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel H-3) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 61 |
| 26 | Viales de reacción LAMP para pruebas de tinción con GelRed® 40X (Panel H-3)…… | 62 |
| 27 | Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP teñidas con GelRed® 40X antes de la corrida (Panel H-3) por electroforesis en gel de agarosa al 1%..... | 62 |

## LISTA DE CUADROS


| Cuadro | | Página |
|---|---|---|
| 1 | Comparación de ventajas y desventajas de estudios de laboratorio…….…..... | 21 |
| 2 | Principales genes blanco de pruebas moleculares para diagnóstico……..... | 24 |
| 3 | Componentes de vial de reacción LAMP…….…….. | 33 |
| 4 | Panel inicial de reacción con diferentes concentraciones de DNA plasmídico……..... | 33 |
| 5 | Reacciones para el proceso de validación de iniciadores…….……. | 34 |
| 6 | Determinación de concentración óptima de iniciadores internos (FIP/BIP)…….……..…..…… | 35 |
| 7 | Determinación de dilución óptima de SYBR® Green I…….…….…..…. | 36 |
| 8 | Determinación de tiempo de reacción óptimo…….…. | 37 |
| 9 | Determinación de temperatura de reacción óptima…….……. | 37 |
| 10 | Determinación de condiciones óptimas para reacción LAMP……..… | 38 |
| 11 | Propiedades del conjunto de iniciadores LAMP diseñados……..…… | 40 |
| 12 | Posibles interferencias por reacción cruzada……..….. | 41 |
| 13 | Concentración de DNA plasmídico purificado aislado de colonias transformadas……..... | 43 |
| 14 | Predicción de dímeros de iniciadores FIP utilizando OligoAnalyzer™…… | 47 |
| 15 | Predicción de heterodímeros de iniciadores FIP y BIP utilizando OligoAnalyzer™…….…… | 49 |

## RESUMEN

La coccidioidomicosis es una enfermedad sistémica con síntomas pulmonares, endémica de regiones desérticas de América. Afecta a sujetos inmunocompetentes e inmunocomprometidos y es causada por *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*. Su diagnóstico es integral, ya que la sintomatología e imagenología pueden ser inespecíficas, por lo que el laboratorio clínico es esencial en el diagnóstico. Las pruebas tradicionales utilizadas tienen ciertas limitaciones y las moleculares son poco accesibles. Por lo que el objetivo del presente trabajo es desarrollar un método de amplificación-isotérmica tipo LAMP para detectar *Coccidioides* spp. el cual sería muy útil para su diagnóstico en la práctica clínica. Para lograrlo, se diseñó un gen sintético del hongo a partir de la región del rDNA 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *C. posadasii*, se sintetizó y se ligó al vector pJET1.2 y se transformó en *E. coli* TOP10 para clonarlo. El DNA plasmídico recombinante resultante se obtuvo por lisis alcalina de colonias transformadas obteniendo concentraciones y purezas adecuadas para utilizarlo como templado en las reacciones de amplificación. Se diseñaron tres pares de iniciadores para la amplificación LAMP del DNA del hongo (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S). En los viales de reacción se mezcló DNA plasmídico, iniciadores, dNTPS, buffer para la enzima, DNA-polimerasa Bst 2.0 WarmStart®, y se incubó a temperaturas de 60-70°C durante 30-50 min. Para la detección de los amplicones se agregó SYBR® Green y se observó bajo luz UV. Además, los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñó con GelRed® 2X/10 min y se fotodocumentó. Las condiciones óptimas del ensayo LAMP fueron: temperatura 65°C, tiempo de reacción 30 min, concentración de iniciadores FIP/BIP 0.2 pmol/uL y SYBR® Green 10X. El ensayo LAMP para detección de 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S sintético de *C. posadasii*, puede mejorarse ensayando otras combinaciones de iniciadores para utilizarse en el diagnóstico clínico.



**Palabras clave:** *Coccidioides* spp., Coccidioidomicosis, Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), Diagnóstico Molecular, Espaciador Transcrito Interno (ITS).

## ABSTRACT

Coccidioidomycosis is a systemic disease showing pulmonary symptoms, and it is endemic in desertic regions of America. This disease affects immunocompetent and immunocompromised patients, and the fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* are the causal agents of coccidioidomycosis. The diagnosis of coccidiomycosis is integral because of the lack of specificity of symptoms and chest x-ray images. Therefore, clinical laboratory tests are essential for diagnosis. Traditional laboratory tests have some disadvantages, and molecular diagnosis is poorly available. Hence, this work objective is to develop an isothermal-amplification LAMP type method to detect *Coccidioides* spp. Such test would be very useful in clinical practice for diagnosis. A synthetic gene was designed from *C. posadasii* rDNA 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S region. This gene was inserted in a pJET1.2 vector and transformed in *E. coli* TOP10 for cloning. The recombinant plasmid DNA was obtained by miniprep from transformant colonies, obtaining satisfactory concentrations and purity for using it as template for amplification reactions. Three pairs of LAMP primers were designed by using genomic sequence 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S. Plasmid DNA, primers, dNTPS, buffer 10X and Bst 2.0 WarmStart® DNA-polymerase were mixed in reaction vials. Reactions were incubated at 60-70°C for 30-50 minutes, SYBR® Green was added and they were observed under UV light to detect amplicons. Additionally, amplification products were analyzed by gel electrophoresis, stained with GelRed® 2X/10 min and photodocumented. Optimal conditions for LAMP assay were 65°C temperature, 30 min reaction time, 0.2 pmol/uL FIP/BIP primers and SYBR® Green 10X. This LAMP assay for detection of synthetic 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S of *C. posadasii*, can be improved by trying other primers for usage on clinical diagnosis.



**Keywords:** *Coccidioides* spp., Coccidioidomycosis, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Molecular diagnosis, Internal Transcribed Spacer (ITS).

# 1. INTRODUCCIÓN

Alejandro Posadas, y su mentor, el famoso patólogo Robert Wernicke, describieron la novedosa "Psorospermiosis Infectante Generalizada" en las lesiones de un soldado argentino. No imaginaban que descubrían una de las enfermedades más emblemáticas de las regiones áridas de las Américas. Así mismo, los estadounidenses Emmett Rixford y Thomas Gilchrist, ignoraban que aquel moho blanquecino aparentemente contaminante, era en realidad la fase infecciosa de un patógeno sumamente virulento (Bonifaz, 2012). Tras numerosas investigaciones sobre la Enfermedad de Posadas, se estableció su naturaleza fúngica y biología, y se denominó Coccidioidomicosis. Más tarde, con la purificación de sus proteínas antigénicas se logró delimitar sus regiones endémicas y pasó a asociarse a regiones desérticas, tal como el estado de Sonora. Hoy en día se sabe que la principal vía de transmisión es el polvo. Debido a esto, algunos grupos riesgo son aquellos individuos que por oficio están en contacto con la tierra como campesinos, mineros, trabajadores de la construcción y soldados (Bonifaz, 2012; Hernandez *et al.*, 2019).

En la actualidad, el enfoque diagnóstico de coccidioidomicosis es integral y el laboratorio clínico juega un papel decisivo en la detección del hongo. Sin embargo, el manejo e interpretación de las pruebas, suele ser complejo, y los resultados pueden ser poco fiables en ciertas circunstancias. Además, algunas pruebas sólo están disponibles en laboratorios de referencia y las pruebas moleculares, prácticamente no están comercialmente disponibles y suelen realizarse en unas pocas instituciones que desarrollaron su propio método (Bonifaz, 2012; Malo *et al.*, 2014). Estas dificultades, representan una erogación significativa de recursos en tiempo y dinero.

Según datos de la Dirección General de Información en Salud, en 2017 se destinó apenas el 2.8% del PIB (casi 32,000 millones de dólares) como gasto público total en salud (Direccion General de Informacion en Salud, 2019). Por otra parte, en 2014 el estado de Arizona en los Estados Unidos de América (EUA), reportó un gasto total de 51 millones de dólares en hospitalización de pacientes con diagnóstico de coccidioidomicosis (Arizona Department of Health Services, 2014). Con base en lo anterior, la optimización de recursos se vuelve clave para la prestación de un servicio de salud digno para la población mexicana, particularmente en la detección de coccidioidomicosis.

El propósito de este trabajo es desarrollar y validar un método de LAMP para la detección de *Coccidioides* spp., que sea sencillo de ejecutar y de bajo costo. Ello, con el fin de probarlo más

delante en muestras clínicas y ponerlo a disposición de los laboratorios clínicos como una prueba de rutina y contribuir de esta manera al diagnóstico de dicha enfermedad

# 2. ANTECEDENTES

## 2.1. Coccidioidomicosis

La coccidioidomicosis es una enfermedad causada por los hongos *Coccidioides immitis* y *posadasii*, cuyas artroconidias ingresan al ser humano generalmente por vía aérea. La entidad clínica más frecuente es la coccidioidomicosis pulmonar primaria que puede tener un pronóstico muy diverso. Puede presentarse como una enfermedad benigna y autolimitada, o una progresiva que puede diseminarse a tejido conectivo, sistema nervioso central (SNC) y órganos. Se trata de una enfermedad endémica de regiones áridas y clima desértico del Continente Americano, suele afectar tanto a sujetos inmunocompetentes, como a inmunocomprometidos a manera de oportunista (Arenas-Guzmán, 2011; Bonifaz, 2012).

### 2.1.1. Aspectos Clínicos

La coccidioidomicosis pulmonar primaria puede tomar un curso subclínico, del 60 al 75% de los casos suelen ser asintomáticos. Los sintomáticos exhiben síntomas similares a la gripe común incluyendo fiebre moderada, cefalea, escalofríos, diaforesis y tos que puede ser no productiva (Arenas-Guzmán, 2011; Bonifaz, 2012). En los casos graves, las personas infectadas pueden presentar fiebre de hasta 40°C, expectoración mucopurulenta o hemoptisis, dolor torácico e incluso derrame pleural.

Por otra parte, se estima que hasta el 5% de los pacientes sintomáticos pueden desarrollar una forma diseminada de coccidioidomicosis (Cox y Magee, 2004). Esta presentación clínica puede tener un avance rápido y mal pronóstico, especialmente aquellos casos de coccidioidomicosis meníngea, la cual puede ser devastadora de no ser tratada oportunamente (Johnson *et al.*, 2018). La coccidioidomicosis primaria cutánea es una patología en la cual el hongo penetra por disrupción cutánea, es mucho menos frecuente, con poco más de 25 casos reportados (Garcia-Garcia *et al.*, 2015).

Las presentaciones secundarias de coccidioidomicosis, son aquellas formas diseminadas de la enfermedad en cuyos casos, el hongo se ha logrado expandir desde su ubicación original hacia otras regiones anatómicas. La diseminación puede ser local, generando cavitaciones (lesiones pulmonares), coccidioidoma (19% de los casos) y síntomas respiratorios más severos. También puede ser exógena, donde puede haber compromiso meníngeo (25%) con síntomas neurológicos y psiquiátricos; lesiones granulomatosas, ulceradas o verrugosas en piel, así como pústulas, nódulos, abscesos y placas en los casos de diseminación hematógena (Arenas-Guzmán, 2011).

### 2.1.2. Biología de *Coccidioides* spp.

Los hongos del género *Coccidioides* son ascomicetos dimórficos, bifásicos; pertenecientes al orden *Onygenales*, al cual pertenecen otros patógenos humanos *e.g. Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides* spp. y *Blastomyces* spp. (Kirkland y Fierer, 2018). Se conocen sólo dos especies: *C. immitis* y *C. posadasii;* las cuales a pesar de guardar diferencias genéticas, no han mostrado tales en su evolución clínica, diagnóstico o tratamiento, hasta la fecha (Hernandez *et al.*, 2019). Son irreconocibles uno del otro por pruebas serológicas, aunque su distinción es posible a partir de técnicas para reconocimiento de polimorfismos (Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2000; Hamm *et al.*, 2019; Tintelnot *et al.*, 2007).

Es comúnmente aceptado que *Coccidioides* tiene una fase saprófita, en la que el hongo crece en el suelo dando lugar a hifas filamentosas que al madurar producen artroconidios tálicos, los cuales son fácilmente desprendibles al medio ambiente de manera natural por el viento o por acción del hombre (Arenas-Guzmán, 2011; Hernandez *et al.*, 2019). La inhalación de la artroconidia conlleva su transporte hacia bronquios terminales y alveolos. La colonización del hongo da lugar a la fase parasitaria, que consta de una esférula refráctil que contiene una gran cantidad de endosporas en su interior (Arenas-Guzmán, 2011; Bonifaz, 2012). Se ha reportado gran variedad de animales infectados por coccidioidomicosis (Reyes-Montes *et al.*, 2016). No obstante, en la vida silvestre, el hongo tiene como hospederos a roedores como el ratón, la zarigüeya y las ardillas (Bonifaz, 2012), los cuales juegan el papel de vector una vez que mueren.

Se ha descrito que las zonas endémicas de *Coccidioides* spp. son principalmente regiones áridas y

semiáridas, de suelo alcalino y poca precipitación (Brown *et al.*, 2013). Sin embargo, aún no existe un consenso sobre las características que el suelo debe cumplir para su desarrollo en el medioambiente. Se ha sugerido que se requiere un cadáver animal sobre el cual desarrollarse (Reyes-Montes *et al.*, 2016). Con base en esto, se ha propuesto la "hipótesis endozóica de mamíferos pequeños"; plantea que *Coccidioides* spp no es un hongo saprófito, sino que forma granulomas asintomáticos en su hospedero, el cual al morir, sirve como fuente de nutrientes que permiten su desarrollo hasta artroconidias (Taylor y Barker, 2019). Esta propuesta se ve apoyada por análisis filogenéticos que muestran la expansión de genes de proteasas y queratinasas, que sugieren que el género ha evolucionado para nutrirse de proteína animal (Desjardins *et al.*, 2011; Sharpton *et al.*, 2009).

### 2.1.3. Patogénesis

Una vez que la artroconidia de *Coccidioides* se ha depositado en los alveolos, aumenta de tamaño y forma una esférula; en cuyo interior alberga cientos de endosporas (Ampel y Hoover, 2015). Cada una de éstas, forma otra esférula que puede infectar el tejido circundante o diseminarse a otro sitio. Por esta razón se considera uno de los hongos con mayor potencial biótico (Bonifaz, 2012), y el más virulento de los hongos patógenos humanos (Arenas-Guzmán, 2011). Existen reportes de dosis infecciosas tan bajas como 10 - 50 artroconidias (Clemons *et al.*, 2007; Converse *et al.*, 1962).

En primera instancia, las artroconidias estimulan la inmunidad innata, logrando ser fagocitadas por macrófagos y células polimorfonucleares. La respuesta va acompañada por la activación de eosinófilos y mastocitos, que liberan gran cantidad de IgE (Arenas-Guzmán, 2011). La transformación de la artroconidia en esférula, se ve estimulada por el cambio de temperatura a 37°C (Converse, 1956), aunque se estima que la infiltración leucocitaria coadyuva en la transición (Galgiani *et al.*, 1982).

La maduración de las esférulas expone una capa membranosa denominada "pared externa de esférula" (SOW), compuesta de polisacáridos, lípidos y proteínas (Cole *et al.*, 1988). Algunas de estas moléculas son antigénicas, principalmente la glicoproteína SOW (SOWgp) que activa la reacción inmune celular y humoral del ser humano (Ampel y Hoover, 2015). Durante las primeras 72 horas de la infección, las artroconidias se transforman en esférulas y el infiltrado leucocitario

comienza a componerse principalmente por células mononucleares (Chiller *et al.*, 2003). *Coccidioides* logra sortear esta adversidad, produciendo a la par de este proceso la metaloproteasa Mep1, que digiere SOWgp de la pared externa de la esférula (Hung *et al.*, 2005), evitando así la activación del sistema inmune adaptativo.

Existen enzimas indispensables para la invasión al hospedero, unas de ellas son elastasas y colagenasas (Arenas-Guzmán, 2011; Bonifaz, 2012). La actividad de las ureasas, contribuyen a la producción de amoniaco, que conlleva al incremento del pH y consecuentemente, al daño a tejido y disminución de la respuesta inmune celular (Hung *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2013). La expresión de las quitinasas 2 y 3, se ha observado indispensable en la remodelación de la pared celular durante transformación de la esférula (Xue *et al.*, 2009) y la producción de melaninas, las hace resistentes a luz UV y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Nosanchuk *et al.*, 2007; Nosanchuk y Casadevall, 2003). Por si fuera poco, las esférulas son demasiado grandes para ser fagocitadas por macrófagos y las endosporas liberadas de ellas, están recubiertas de mucílago que las hace resistentes a la destrucción por macrófagos (Arenas-Guzmán, 2011).

### 2.1.4. Epidemiología

Los hongos del género *Coccidioides* son exclusivamente endémicos de América, aunque se han exportado a otros países (Al-daraji *et al.*, 2009; Corpolongo *et al.*, 2014; Hemashettar y Padhye, 2011; Molina-Morant *et al.*, 2018). Habitan zonas desérticas con temperaturas extremas en veranos de hasta 50°C y ligeramente bajas en invierno, que facilitan su dispersión y crecimiento, respectivamente (Brown *et al.*, 2013; Laniado-Laborín *et al.*, 2019; Smith y Beard, 1946). Las regiones endémicas de *Coccidioides* spp., se caracterizan por un nivel de precipitación bajo (10 – 50 cm de lluvia por año). Los suelos en que se desarrolla, típicamente tienen una composición salina elevada y pH alcalino, y pueden llegar a encontrarse artroconidias viables bajo tierra a profundidades de 10 – 30 cm (Laniado-Laborin, 2007).

La mayor parte del territorio altamente endémico de *Coccidioides* spp., radica entre la frontera sur de EUA y norte de México. Los estados de Arizona y California, son los más afectados, aunque también hay reportes en Utah, Nevada, Nuevo México y Texas (Hernandez *et al.*, 2019). En nuestro país, los estados de Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, son

los más aquejados por la enfermedad, aunque la información epidemiológica es insuficiente (Laniado-Laborín *et al.*, 2019). La zona endémica de *Coccidioides* spp. en México, se extiende a Sinaloa y Durango; y en el centro del país, se han encontrado focos endémicos en el valle de Tepalcatepec, Michoacán, Guerrero, Colima y Jalisco (Bonifaz, 2012). Existen otras dos regiones de menor endemicidad, una en Centroamérica, particularmente Guatemala y zonas del norte de Sudamérica (Laniado-Laborín *et al.*, 2019). La otra es la región del Chaco, entre Argentina y Paraguay (Bonifaz, 2012).

Una de las diferencias más notorias entre las especies de *Coccidioides* es su distribución geográfica. Mientras que *C. immitis* predomina en California y algunas zonas aisladas de Baja California, *C. posadasii* se extiende en el resto de las regiones endémicas del sur de Estados Unidos, norte de México y zonas de América Latina (Hernandez *et al.*, 2019). De ahí, que anteriormente se les conocía como poblaciones California y No California. En fechas recientes, *C. immitis* se ha extendido al estado de Washington donde se detectaron infecciones autóctonas y se aisló el hongo de pacientes, animales y suelo (James *et al.*, 2019). Lo anterior sugiere que el organismo es endémico en esa región de Estados Unidos, mostrando su expansión a otras zonas y la necesidad de un diagnóstico clínico rápido, eficiente y accesible en costo.

Existen diversos factores de riesgo para adquirir coccidioidomicosis o sufrir diseminación, entre ellos destacan edad mayor a 65 años (Sunenshine *et al.*, 2007); semana de gestación en mujeres embarazadas (Crum y Ballon-Landa, 2006); ascendencia africana (Rosenstein *et al.*, 2001; Smith y Beard, 1946); inmunosupresión, como es el caso de pacientes trasplantados (Blair y Logan, 2001; Cohen, 1982), diabéticos (Santelli *et al.*, 2006), VIH positivos con cuenta baja de células $CD4^+$ (Ampel *et al.*, 1993) y tratados con modificadores de respuesta biológica o fármacos antirreumáticos (Bergstrom *et al.*, 2004; Mertz y Blair, 2007; Taroumian *et al.*, 2012).

## 2.2. Diagnóstico de Coccidioidomicosis

El diagnóstico de coccidioidomicosis humana es integral. Esto se debe a que la sintomatología y los hallazgos por imagenología pueden asemejarse a otras patologías infecciosas y no infecciosas (Donovan *et al.*, 2017; Malo *et al.*, 2014). Por tanto, el laboratorio clínico juega un papel esencial en el diagnóstico. Existen tres abordajes principales: 1) métodos por microscopía, que incluyen la

histopatología y el examen directo; 2) métodos microbiológicos, que involucran el cultivo del hongo y 3) métodos serológicos (Malo *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2013). Todos ellos, tienen ventajas y desventajas que hay que tener en cuenta en la interpretación de resultados (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Comparación de ventajas y desventajas de estudios de laboratorio.**

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| **Microscopía** | |
| • Observación directa<br>• Bajo costo<br>• Especímenes varios<br>• Ciertas tinciones mejoran la sensibilidad y especificidad en examen directo (*e.g.* azul de lactofenol) y en histopatología (*e.g.* metamina plata de Grocott) | • Confusión con otras estructuras u hongos (*e.g. B. dermatitidis*)<br>• La histopatología puede carecer de sensibilidad y especificidad |
| **Cultivo** | |
| • Demostración directa<br>• Crecen en medios habituales para hongos (*e.g.* Sabouraud)<br>• El crecimiento toma en promedio 4 días, puede tardar hasta 3 semanas | • Nivel de bioseguridad 3<br>• Requiere adiestramiento para diferenciar hongos contaminantes<br>• Baja sensibilidad y recuperación en LCR<br>• Debe confirmarse por microscopía o hibridación *In situ*<br>• No se recomienda guardar cultivos por más de 5 días |
| **Intradermorreacción** | |
| • Fácil aplicación<br>• Bajo costo<br>• Resultado rápido<br>• Descarte de enfermedad o diseminación (Bonifaz, 2012) | • Su valor principal es de primo-contacto (epidemiológico)<br>• Resultados positivos se muestran 3 - 21 días después del inicio de los síntomas |
| **Serología** | |
| • IgM es marcador de enfermedad temprana, mientras IgG es de estadio tardío, monitoreo y pronóstico<br>• Aumento de IgG o título > 1:32 indica aumento de actividad o diseminación (Saubolle *et al.*, 2007)<br>• Los ensayos EIA están disponibles comercialmente. IgM e IgG juntos mejoran la sensibilidad<br>• CF e IDF son métodos de referencia en coccidioidomicosis meníngea. Sin embargo, carecen de sensibilidad | • Poco sensibles en infección temprana.<br>• IDF requiere 4 días de incubación para descartar falsos negativos<br>• IgM puede dar falsos positivos debido a baja especificidad<br>• IgG positivo por EIA requiere confirmación por IDF o CF<br>• La producción de anticuerpos puede verse impedida en inmunocomprometidos |

*Tabla adaptada de Gastélum-Cano *et al.* (2021)

### 2.2.1. Detección de *Coccidioides* spp. por Laboratorio Clínico

Los métodos por microscopía han sido desde su origen, los primeros en asistir al diagnóstico. Alejandro Posadas y Robert Wernicke, describieron la fase parasitaria de *Coccidioides* spp. observando tejido cutáneo de un paciente con lesiones en piel al microscopio (Posadas, 1928). La ventaja de estas técnicas es que están ampliamente disponibles y dan evidencia directa del hongo, por tanto, son patognomónicas. Debido a esto, la histopatología junto con el cultivo del hongo, son consideradas el "estándar de oro" en el diagnóstico de coccidioidomicosis (Chiller *et al.*, 2003; Malo *et al.*, 2014). La histopatología ha logrado sensibilidad hasta de 88.6% (Hayden *et al.*, 2001), mientras que en el citológico se ha observado de 30 – 45% en lavado broncoalveolar (DiTomasso *et al.*, 1994).

El cultivo de *Coccidioides* spp. es el método referente por elección para el diagnóstico clínico, es relativamente fácil cultivarlo y crece en cualquier medio para hongos (*e.g.* Sabouraud) con o sin antibióticos. No obstante, es preferible no llevarlo a cabo en laboratorios sin instalaciones adecuadas debido a que representa un riesgo para la salud del personal y por tanto, debe ser manejado bajo medidas especiales (Arenas-Guzmán, 2011). La coccidioidomicosis, es la micosis más frecuentemente adquirida como producto de un accidente de laboratorio (Baron y Miller, 2008) y la décima entre las enfermedades más comúnmente adquiridas durante el trabajo en el laboratorio clínico (Bonifaz, 2012). Por tanto, es preciso extremar precauciones al manipular cultivos confirmados y sospechosos de este hongo.

La prueba subdérmica (intradermorreacción) para coccidioidomicosis, evidencia la inmunidad por un mecanismo de hipersensibilidad retardada, mediado por inmunidad celular, similar a la prueba de Mantoux para tuberculosis (Actor, 2012). Existen actualmente dos antígenos solubles de *Coccidioides* en el mercado, la Coccidioidina y la Esferulina. Estos se inoculan en la cara anterior del antebrazo con una jeringa para insulina, con un ángulo de aproximadamente 10° con respecto a la superficie dérmica. La primera lectura se realiza a las 36 - 48 horas después y se basa en el tamaño de induración (descartando el eritema) (Wack *et al.*, 2015), causada por células T $CD4^+$, citocinas proinflamatorias (IFN-γ, TNF-α, IL-1 e IL-2) y macrófagos. De aquí que una de sus principales utilidades sea la identificación de casos anérgicos (incapaces de responder inmunológicamente ante un antígeno) en coccidioidomicosis diseminada. Estas pruebas pueden ser

auxiliares en el diagnóstico, aunque su principal uso es epidemiológico.

Los ensayos serológicos son los más utilizados para el diagnóstico de coccidioidomicosis. Estos se dividen en tres principales: inmunodifusión (IDF), fijación del complemento (CF) y ensayos inmunoenzimáticos (EIA) (Malo *et al.*, 2014). Su objetivo es la demostración de precipitinas (IgM), así como anticuerpos fijadores del complemento (IgG). Estos ensayos tienen una amplia variabilidad en sensibilidad y especificidad, por lo que requieren apoyarse en el seguimiento con más de una muestra, sintomatología y frecuentemente, en otros estudios de laboratorio. Además, algunos ensayos están disponibles sólo en laboratorios de referencia (Malo *et al.*, 2014). Aunque los ensayos serológicos son útiles, no pueden utilizarse por sí solos para el descarte de coccidioidomicosis (Saubolle, 2007).

### 2.2.2. Métodos Moleculares

Las primeras técnicas moleculares para detección de *Coccidioides* fueron diseñadas por Gen-probe Inc. a principios de los 90's, basadas en hibridación *in situ* con sondas de DNA y utilizando como blanco rRNA en cultivos del hongo (Espinel-Ingroff, 2003; Kaufman, 1992; Stockman *et al.*, 1993). En la actualidad, el diagnóstico molecular de coccidioidomicosis utiliza dos técnicas: la amplificación de señal por hibridación *in situ* de ácidos nucleicos y la amplificación de ácidos nucleicos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2008), que incluye las variantes de PCR. Estas últimas, han demostrado excelentes resultados de especificidad y sensibilidad tanto analítica como clínica mediante PCR tiempo-real (Binnicker *et al.*, 2007; Gago *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2015; Saubolle *et al.*, 2018). No obstante, algunas de estas pruebas se realizan sólo en pocas instituciones y las pruebas comerciales están validadas sólo para ciertos especímenes clínicos (Saubolle *et al.*, 2018); además de ser económicamente poco accesibles.

El Cuadro 2, muestra algunas regiones blanco usadas con éxito en ensayos moleculares para el análisis de *Coccidioides* en muestras clínicas. Las técnicas de hibridación *in situ* están validadas sólo para uso en cultivo y se limitan a la confirmación (Malo *et al.*, 2014; Stockman *et al.*, 1993). Por otro lado, aunque el ensayo en región Ag2/PRA fue validado en varios tipos de muestras incluyendo especímenes clínicos, es necesario señalar que la mayoría fueron cultivos positivos.

Los ensayos que utilizan ITS2, han sido estudiados en variedad y cantidad suficiente de especímenes clínicos. Se sabe que pueden mostrar una sensibilidad reducida, debido al efecto de la formalina en tejidos fijados. Sin embargo, éstos mostraron excelentes resultados en especímenes respiratorios y tejido fresco (Binnicker *et al.*, 2007). No obstante, se requieren estudios adicionales en muestras de líquido cefalorraquídeo en virtud de haber mostrado falsos negativos (Vucicevic *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que, aunque la cantidad de marcadores moleculares existentes para la detección de *Coccidioides* spp. no se limitan a los mencionados anteriormente, no todos están validados para su uso en muestras clínicas. Existen marcadores prometedores, como los diseñados para ITS1 (Gago *et al.*, 2014) y $SCAR_{300}$ (Reyes-Montes *et al.*, 2019) que están en proceso de validación clínica.

**Cuadro 2. Principales genes blanco de pruebas moleculares para diagnóstico.**

| Año | Método | Región Blanco | Muestras | Clínica | | Disponibilidad |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Sp (%) | Sn (%) | |
| 1993 | Hibridación *In Situ* | rRNA 28S | Cultivo | 100 | 99.2 | Comercial (Stockman *et al.*, 1993) |
| 2004 | PCR Tiempo Real | Ag2/Para | Varias | 100 | 100 | No comercial (Bialek *et al.*, 2004) |
| 2007 | PCR Tiempo Real | ITS2 | Varias | 98.1 - 100 | 73.4 - 100 | Referencia (Binnicker *et al.*, 2007) |
| 2016 | PCR Tiempo Real | SSCR[I] | LBA y LB | 100 | 95.9 - 99.6 | Comercial (Saubolle *et al.*, 2018) |

Sp = Especificidad; Sn = Sensibilidad. [I]Secuencia similar a copia de retrotransposón. LBA = Lavado Broncoalveolar; LB = Lavado Bronquial.

## 2.3. Genómica de *Coccidioides* spp.

El genoma de *Coccidioides* spp. tiene una longitud aproximada de 28.2 Mb, con 5 cromosomas (Pan y Cole, 1995; Sharpton *et al.*, 2009). Son haploides y no se les ha observado reproducción

sexual (Sharpton *et al.*, 2009), aunque sí llevan a cabo recombinación. Se sabe que *C. immitis* y *C. posadasii* son genéticamente diferentes; sin embargo, son morfológicamente idénticas (Kirkland y Fierer, 2018; Whiston y Taylor, 2014). El primer genoma secuenciado de *Coccidioides*, fue el de la cepa *C. immitis RS* por el Broad Institute en 2004, y con posterioridad, por el instituto Craig Venter para la de *C. posadasii c735* en 2009, a partir de aislados de pacientes (Whiston y Taylor, 2014). Hasta la fecha, estas aportaciones han tenido amplios beneficios en la elucidación de su evolución, biología, epidemiología y diagnóstico (Cuomo, 2017). En 2019, se obtuvo un genoma de referencia mejorado de *C. immitis* WA-211 de aislados de suelo (Acceso GenBank RHJW02000000). Su tamaño es 27.4 Mb, contiene 7,815 genes codificantes y 21 conglomerados de metabolitos secundarios (Teixeira *et al.*, 2019).

Los transposones son frecuentes en el género *Coccidioides*, aunque la mayoría se encuentran degenerados y no tienen los genes necesarios para transposición (Kirkland y Muszewska, 2018). De hecho, el 18% del genoma del hongo consiste de DNA repetitivo, como medida de control contra su proliferación (Neafsey *et al.*, 2010). El transposón más común en *Coccidioides* es Gypsy, un transposón similar a retrovirus frecuente en hongos (Kirkland y Muszewska, 2018). Estas características del genoma han sido previamente aprovechadas para el diagnóstico, valiéndose de las características de repetitividad para mejorar su sensibilidad (Saubolle *et al.*, 2018).

### 2.3.1. Genes Potencialmente Útiles para Diagnóstico Molecular

*Coccidioides* es un género que se ha diferenciado de otros miembros del orden *Onygenales* y ha evolucionado para alimentarse de proteína animal, expandiendo y ganando genes especializados. Entre éstos se encuentran genes para proteínas de unión a hemo, enzimas del metabolismo de alantoina, transportadores transmembrana, lipasas, proteínas homólogas a micotoxinas, proteasas y queratinasas (Sharpton *et al.*, 2009). *Coccidioides*, tiene alrededor de 800 genes únicos en su género, los cuales son expresados principalmente durante la endoesporulación (Whiston y Taylor, 2016). De éstos, 152 genes son sobreexpresados en el estadio de esférula y se relacionan con el metabolismo de carbohidratos y remodelación de pared celular (Kirkland y Fierer, 2018).

La variedad de genes provee una gran cantidad de candidatos posibles para blancos de pruebas

moleculares. No obstante, a fines de proveer una prueba veraz y oportuna, ciertos criterios deben de tomarse en cuenta para la selección de un posible candidato. Entre éstos, la frecuencia de polimorfismos, el patrón de herencia, su abundancia en el genoma, que ocurra bajo selección neutral, que sea accesible y reproducible, son factores deseables (Duarte-Escalante *et al.*, 2014). Por lo tanto, la selección de un blanco molecular deberá realizarse de manera cuidadosa.

### 2.3.2. Regiones ITS como Blancos Moleculares

Las secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés), forman parte de la región cromosomal (rDNA) que codifica para el RNA ribosomal (rRNA). Han sido ampliamente estudiadas por su valor en la identificación filogenética, siendo referidas como "el código de barra" de los hongos (Schoch *et al.*, 2012). La región que codifica para rRNA en hongos, tiene una longitud aproximada de 650 pb e incluye los genes para las subunidades 18S, 5.8S y 28S. Las dos regiones espaciadoras ITS (ITS1 e ITS2) se encuentran intercaladas entre los rDNAs, muestran una alta divergencia evolutiva y son típicamente especie-específicas (Bruns y Shefferson, 2004). Hasta la fecha, no se conoce un rol biológico para las regiones ITS, aunque se les considera regiones no codificantes (Iwen *et al.*, 2002).

En el pasado se han estudiado las secuencias nucleotídicas ITS como regiones blanco para diferenciar género y especie de diversos hongos causantes de enfermedades humanas (Pryce *et al.*, 2003). También han sido exploradas para la detección de *Coccidioides* spp. con una orientación al diagnóstico clínico, obteniéndose un excelente desempeño (Binnicker *et al.*, 2007; Gago *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2015; Vucicevic *et al.*, 2010). *Coccidioides* spp. posee una cantidad variable de rDNA, y por tanto de ITS, de acuerdo con la cepa aislada. El número de copias oscila entre 20 y 146 por genoma, lo que incrementa la sensibilidad para una prueba molecular en al menos 20 veces (Johnson *et al.*, 2014), en relación con un gen de una sola copia por genoma. Esto dificulta a su vez la cuantificación del hongo por técnicas empleadas para carga parasitaria (*e.g.* PCRq). No obstante, es una excelente opción para una prueba cualitativa, en virtud de su especificidad y abundancia natural.

## 2.4. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)

La Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP, por sus siglas en inglés), es un método molecular reportado por primera vez por Notomi *et al.* (Notomi *et al.*, 2000). Recientemente ha tenido un auge de publicaciones y gran impacto en el diagnóstico clínico, calidad alimentaria y monitoreo ambiental (Becherer *et al.*, 2020). Ha sido explorada como prueba de punto de atención (POCT, por sus siglas en inglés) para el control de enfermedades infecciosas en países en vías de desarrollo, debido a sus características de costo-efectividad y sencillez en el proceso (Boehme *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2016). Además, ha demostrado buen desempeño de sensibilidad, especificidad y estabilidad frente a condiciones ambientales, y sustancias potencialmente interferentes (Francois *et al.*, 2011; Kaneko *et al.*, 2007).

### 2.4.1. Fundamento

El fundamento de LAMP se basa en la síntesis de DNA a partir de una secuencia molde, utilizando un par de iniciadores internos para ambas cadenas de DNA (FIP/BIP). El producto de esta síntesis, es desplazado del molde por una polimerasa de DNA (Notomi *et al.*, 2000), que simultáneamente, sintetiza una nueva cadena a partir de un par de iniciadores que hibridan en regiones más externas (F3/B3) del blanco. El producto desplazado, genera una cadena sencilla libre que tiene una región (F1c/B1c) en una extensión del iniciador externo (FIP/BIP) que es complementaria con una secuencia recién sintetizada (F1/B1) y con la cual se forma un bucle. Los bucles sirven como nuevos blancos para iniciadores internos y externos, y son posteriormente desplazados para obtener dos productos: la cadena con el bucle original y una nueva cadena con bucle y el doble de longitud de la original (Notomi *et al.*, 2000).

El método LAMP original utiliza dos pares de iniciadores, que reconocen seis secuencias, pero fue optimizado por Nagamine *et al.* (2002), quien eficientó la reacción adicionando un par de iniciadores específicos para el bucle. Este método, conduce a la autopropagación del material genético, produciendo cantidades de DNA de aproximadamente $10^9$ copias en 1 hora (Notomi *et al.*, 2000).

### 2.4.2. Ventajas del Método LAMP como Prueba Molecular

Las ventajas intrínsecas del método son la alta especificidad debido a que utiliza de 4 - 6 iniciadores que hibridan 6 - 8 secuencias específicas, la independencia del termociclador debido a su naturaleza isotérmica y la gran cantidad de DNA producido en corto tiempo (Lapierre y Drancourt, 2018). Los productos obtenidos son fáciles de observar por distintos métodos que se dividen en dos tipos: métodos independientes de secuencia y métodos específicos de secuencia (Becherer *et al.*, 2020).

Los métodos independientes de secuencia son relativamente sencillos. Entre estos están la turbidimetría por precipitación con pirofosfato de magnesio (Mori *et al.*, 2001), fluorescencia directa con luz UV usando agentes intercalantes (Lapierre y Drancourt, 2018), colorimetría basada en cambios de pH (Goto *et al.*, 2009) y observación directa (Kuboki *et al.*, 2003). No obstante, estos métodos no tienen la capacidad de distinguir dímeros de iniciadores y productos inespecíficos que pueden ser reportados como falsos positivos. Por otro lado, los métodos específicos de secuencia superan estos obstáculos debido a su diseño selectivo. Existen a la fecha al menos 34 métodos diferentes de este tipo (Becherer *et al.*, 2020).

Previamente, se han diseñado ensayos LAMP para la detección de patógenos respiratorios con un enfoque diagnóstico, entre ellos, *Mycobacterium* spp. En uno de estos estudios se obtuvo concordancia de especie del 100% y sensibilidad analítica de $10^2$ UFC/mL en cultivo y $10^3$ UFC/mL en expectoración (Lapierre y Drancourt, 2018). Mientras que, en otro trabajo, se encontró sensibilidad y especificidad diagnóstica de 77.7% y 98.1%, respectivamente, en comparación con el sistema GeneXpert® (Shete *et al.*, 2019). Estas características previamente mencionadas, hacen de LAMP una excelente opción para implementar como prueba de punto de atención y una opción al alcance de los laboratorios de rutina.

## 3. HIPÓTESIS

La Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) puede ser utilizada para detectar la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *Coccidioides* spp. en un plásmido recombinante.

# 4. OBJETIVOS

## 4.1. Objetivo General

Desarrollar un ensayo LAMP para detección de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *Coccidioides* spp. insertada en un plásmido recombinante.

## 4.2. Objetivos Específicos

1. Diseñar y clonar un plásmido recombinante que incluya la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *C. posadasii*.
2. Diseñar y validar un conjunto de iniciadores LAMP para detección de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *Coccidioides* spp.
3. Determinar las condiciones óptimas de temperatura, tiempo, concentración de iniciadores y tinción de una reacción LAMP para detección de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *Coccidioides* spp.

# 5. MATERIALES Y MÉTODOS

## 5.1. Tipo de Estudio

Se llevó a cabo el desarrollo de un protocolo para la identificación de DNA plasmídico sintético de *Coccidioides* spp. por un ensayo LAMP. Esta investigación es de ciencia aplicada y de tipo experimental en donde se pretende generar conocimientos que puedan ser utilizados a futuro en la práctica clínica para su uso en el laboratorio clínico.

## 5.2. Desarrollo del Ensayo LAMP

### 5.2.1. Diseño de Control Positivo

Para desarrollar la PCR isotérmica se diseñó un gen sintético gBlock (Integrated, DNA Tecnologies; Coralville, EUA), conteniendo la región del rDNA 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *C. posadasii* (GenBank: NR_145259.1). El gen sintético se llevó a una concentración de 10 ng/µL y se ligaron 10 ng a 25 ng del vector pJET1.2 blunt (Thermofisher Scientific; Waltham, EUA) en una reacción de 10 µL siguiendo las especificaciones del fabricante. Después se transformó en células de *E. coli* TOP10 (pJE) por medio de choque térmico, incubando primero en hielo las células a las que se agregó 1.5 µL de la reacción de ligación y luego a 42°C por 1.5 min, y nuevamente en hielo. Luego se agregó 250 µL de medio SOC a las células y se incubó con agitación constante durante una hora a 37°C. Las células (10 µL, 100 µL y el resto) se sembraron en placas con agar LB adicionadas con ampicilina (100 µg/mL), y se dejaron incubar durante toda la noche a 37°C. Se seleccionaron 4 colonias recombinantes las cuales se sembraron en 5 mL de caldo LB con 100 µg/mL de ampicilina. De los cultivos se obtuvo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina o miniprep, el cual fue posteriormente purificado. La presencia de la clona recombinante pJET1.2-

18S-*ITS1-5.8S-ITS2-28S* se corroboró por PCR de colonia usando los iniciadores incluidos en el sistema de clonación del vector pJET1.2 (Green y Sambrook, 2012). Se cuantificó el DNA plasmídico en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermofisher Scientific) a 260 nm, y se guardó en congelación hasta su uso.

### 5.2.2. Diseño de Iniciadores para la Amplificación Isotérmica

El diseño de iniciadores se realizó con el software Primer Explorer V.5 (Eiken Chemical Co.; Tokyo, Japón), utilizando la secuencia rDNA 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S mencionada anteriormente y los parámetros sugeridos por Eiken Chemical Co. (2019) en su guía para diseño de iniciadores (Eiken Chemical Co. Ltd., 2019). Éstos fueron sintetizados en Integrated DNA Technologies (IDT, EUA) (Cuadro 11). La funcionalidad de los iniciadores se corroboró ensayando la amplificación del gen sintético clonado en el plásmido (pJET1.2-18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S). Se probaron diferentes concentraciones del plásmido extraído en viales de reacción de LAMP, tal y como se especifica más adelante. Los productos de reacción LAMP se corrieron en gel de agarosa al 1% (Bio-Rad; Hércules, EUA) con buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) al 0.5X a 80 V y se tiñeron con Gel Red® (Biotium; Fremont, EUA) 2X durante 10 min, para comprobar el patrón de bandas en escalera, típico de las reacciones LAMP.

### 5.2.3. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)

Para llevar a cabo la amplificación isotérmica, se utilizó una mezcla de reacción en un volumen total de 25 µL a la cual se agregó DNA polimerasa *Bst* 2.0 WarmStart® (New England Biolabs; Ipswitch, EUA) (Cuadro 3). La fase inicial se llevó a cabo analizando un panel de reacciones con concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 ng de DNA plasmídico pJET1.2-18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S (Cuadro 4). La reacción se incubó a 60°C en un termociclador Bio-Rad DNA Engine® Peltier

Thermal Cycler (Hercules, EUA) durante 50 min y se detuvo al calentar a 80 °C por 10 min. Después de la incubación, se añadió 1 µL de SYBR® Green 20X (Thermofisher Scientific) a cada tubo de reacción y se mezcló. La interpretación de resultados se llevó a cabo observando el vial bajo luz UV a 302 nm en un Transiluminador LM-20e VWR Scientific (Radnor, EUA). La observación del color verde fluorescente en la reacción, debido a que el colorante se intercala en los pares de bases de los productos de la amplificación, indicó un resultado positivo; permitiendo detectar de esta manera el DNA de *Coccidioides* spp. La ausencia de fluorescencia se interpretó como un resultado negativo de la amplificación.

**Cuadro 3. Componentes del vial de reacción LAMP.**

| Reactivo | Concentración | Concentración final | Volumen (µL) |
|---|---|---|---|
| Buffer *Bst* | 10X | 1X | 2.5 |
| dNTPs | 10 mM | 400 pmol/µL | 1.0 |
| FIP/BIP | 20 µM | 1.6 pmol/µL | 2.0 |
| F3/B3 | 5 µM | 0.2 pmol/µL | 1.0 |
| FL/BL | 10 µM | 0.4 pmol/µL | 1.0 |
| DNA pol BST 2.0 | 8,000 U/mL | 8 U | 1.0 |
| Templado | 10 – 100 ng/µL | 10-100 ng | 1.0 |
| Agua | - | - | 15.5 |
| Total | - | - | 25.0 |

**Cuadro 4. Panel inicial de reacción con diferentes concentraciones de DNA plasmídico.**

| Reacción | Templado (ng) |
|---|---|
| L | Marcador de peso molecular |
| 1 | 10 |
| 2 | 25 |
| 3 | 50 |
| 4 | 75 |

| | |
|---|---|
| 5 | 100 |
| C1 | - |
| C2 | 10 |

C-: vial con 25 µL de agua y 1 µL de SYBR® Green 20X. C1: vial de reacción completo sin templado. C2: vial de reacción con templado, sin iniciadores externos F3/B3.

### 5.2.4. Validación de Iniciadores para LAMP

Posterior a la fase inicial, se procedió a realizar la validación de los iniciadores para investigar la posibilidad de estructuras secundarias que pudieran generar falsos positivos. La temperatura de reacción se elevó a 65°C y se incubó por 50 min, para descartar posibles interacciones intra e intermoleculares entre los iniciadores LAMP debido a que dos de ellos son oligonucleótidos de aproximadamente 40 bases. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado: un vial de reacción sin DNA blanco (control negativo) y otro vial en que se agregó 1 µL de DNA plasmídico pJET1.2-18S-*ITS1-5.8S-ITS2-28S* (10 ng/µL) (control positivo). Las reacciones se organizaron en dos paneles de 12 reacciones cada uno: en el panel A, se agregó cada uno de los iniciadores por separado para probar si presentaban interacciones intramoleculares; en el panel B, se agregaron los pares de iniciadores por separado, y después, en conjunto con otro par de iniciadores para detectar interacciones intermoleculares (Cuadro 5). Las reacciones en el vial se revelaron con SYBR® Green 20X y se analizaron por electroforesis como se explicó previamente. El volumen de reacción se mantuvo en 25 µL en todo momento, sustituyendo los reactivos excluidos con diluyente (agua).

**Cuadro 5. Reacciones para el proceso de validación de iniciadores.**

| **Panel A*** | | | **Panel B*** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Reacción** | **Iniciador** | **Templado (10 ng)** | **Reacción** | **Iniciadores** | **Templado (10 ng)** |
| 1 | FIP | Sí | 1 | FIP/BIP | Sí |
| 2 | FIP | No | 2 | FIP/BIP | No |
| 3 | BIP | Sí | 3 | F3/B3 | Sí |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 | BIP | No | 4 | F3/B3 | No |
| 5 | F3 | Sí | 5 | FL/BL | Sí |
| 6 | F3 | No | 6 | FL/BL | No |
| 7 | B3 | Sí | 7 | FIP/BIP + F3/B3 | Sí |
| 8 | B3 | No | 8 | FIP/BIP + F3/B3 | No |
| 9 | LF | Sí | 9 | FIP/BIP + LF/LB | Sí |
| 10 | LF | No | 10 | FIP/BIP + LF/LB | No |
| 11 | LB | Sí | 11 | F3/B3 + LF/LB | Sí |
| 12 | LB | No | 12 | F3/B3 + LF/LB | No |

C-: Vial con 25 µL de agua destilada y 1 µL de SYBR® Green 20X. *Tinción con SYBR® Green 20X

### 5.2.5. Determinación de Condiciones Óptimas para Amplificación Isotérmica.

La determinación de condiciones óptimas para el ensayo LAMP, se llevó a cabo nuevamente con reacciones por duplicado: un vial de reacción (positiva) con 10 ng del DNA plasmídico recombinante (control positivo) y otro vial de reacción (negativa) sin DNA blanco. La temperatura de incubación se elevó esta vez a 68°C por 50 min, buscando evitar posibles interacciones intra e intermoleculares entre iniciadores. En un primer abordaje, se evaluó la concentración de los iniciadores internos FIP/BIP diluyendo su concentración con agua estéril en un intervalo desde 20 µM hasta 2.5 µM y probándose en los viales de reacción de LAMP que formaron parte de los paneles C y D (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Determinación de concentración óptima de iniciadores internos (FIP/BIP).**

| **Panel C*** | | | **Panel D*** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **FIP/BIP (µM)** | **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **FIP/BIP (µM)** |
| 1 | Sí | 20 | 1 | Sí | 10 |
| 2 | No | 20 | 2 | No | 10 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 | Sí | 10 | 3 | Sí | 5 |
| 4 | No | 10 | 4 | No | 5 |
| 5 | Sí | 5 | 5 | Sí | 2.5 |
| 6 | No | 5 | 6 | No | 2.5 |

C: vial de reacción completo con 1 µL de templado (10 ng/µL) y FIP/BIP 5 µM (sin incubación). *Tinción con SYBR® Green 20X

A continuación, se procedió a evaluar la dilución óptima de SYBR® Green en el intervalo de 20X hasta 1X y utilizando una concentración de iniciadores FIP/BIP de 2.5 µM en la batería de reacciones denominada panel E (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Determinación de dilución óptima de SYBR® Green I.**

| Panel E | | |
|---|---|---|
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **SYBR® Green Dilución** |
| 1 | Sí | 10X |
| 2 | No | 10X |
| 3 | Sí | 5X |
| 4 | No | 5X |
| 5 | Sí | 2.5X |
| 6 | No | 2.5X |
| 7 | Sí | 1X |
| 8 | No | 1X |

C-: vial de reacción completo con 1 µL de templado (10 ng), FIP/BIP 2.5 µM y teñido con SYBR® Green 20X (sin incubar).

Posteriormente, se realizaron ensayos LAMP en función de tiempo de reacción, comparando la concordancia de los resultados de reacciones (positivo o negativo) entre corridas con tiempos de reacción en el intervalo de 30 a 50 min, este grupo de reacciones se denominó panel F (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Determinación de tiempo de reacción óptimo.**

| Panel F | | |
|---|---|---|
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **Tiempo de reacción (min)** |
| 1 | Sí | 30 |
| 2 | No | 30 |
| 3 | Sí | 40 |
| 4 | No | 40 |
| 5 | Sí | 50 |
| 6 | No | 50 |

C: vial de reacción con 1 µL de templado (10 ng/µL), FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación).

Así mismo, se probó la concordancia del ensayo utilizando diferentes temperaturas de reacción en el intervalo de 60 - 68°C, cuyo conjunto de reacciones se denominó panel G (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Determinación de temperatura de reacción óptima.**

| Panel G | | |
|---|---|---|
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **Temperatura (°C)** |
| 1 | Sí | 65 |
| 2 | No | 65 |
| 3 | Sí | 66.5 |
| 4 | No | 66.5 |
| 5 | Sí | 67 |
| 6 | No | 67 |
| 7 | Sí | 68 |
| 8 | No | 68 |

C: vial de reacción con 1 µL de templado (10 ng/µL), FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación).

Adicionalmente, se realizaron pruebas con condiciones intermedias de temperatura y tiempo, en el que se mantuvo la concentración de iniciadores FIP/BIP en 2.5 µM y la dilución de SYBR® Green a 10X. Este conjunto de reacciones se denominó paneles H (H1-H3) (Cuadro 10). Finalmente, se realizó una prueba para comparación de tinciones en el vial de reacción. Se agregaron 2µL de GelRed® 40X a viales de reacción con la misma característica que el panel H-3. El resultado se observó también bajo luz UV a 302 nm en un transiluminador, se tiñeron nuevamente con GelRed® 2X por 10 min y se analizó por electroforesis en gel de agarosa.

**Cuadro 10. Determinación de condiciones óptimas para reacción LAMP.**

| **Panel H-1** | | | |
|---|---|---|---|
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **Temperatura (°C)** | **Tiempo de reacción (min)** |
| 1 | Sí | 66.5 | 50 |
| 2 | No | 66.5 | 50 |
| 3 | Sí | 68 | 40 |
| 4 | No | 68 | 40 |
| **Panel H-2** | | | |
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **Temperatura (°C)** | **Tiempo de reacción (min)** |
| 1 | Sí | 66.5 | 40 |
| 2 | No | 66.5 | 40 |
| 3 | Sí | 67 | 30 |
| 4 | No | 67 | 30 |
| 5 | Sí | 66.5 | 30 |
| 6 | No | 66.5 | 30 |
| **Panel H-3** | | | |
| **Reacción** | **Templado (10 ng)** | **Temperatura (°C)** | **Tiempo de reacción (min)** |
| 1 | Sí | 65 | 30 |
| 2 | No | 65 | 30 |
| 3 | Sí | 70 | 30 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 4 | No | 70 | 30 |
| 5 | Sí | 66.5 | 40 |
| 6 | No | 66.5 | 40 |

C: vial de reacción con 1 µL de templado (10 ng/µL), FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación)

# 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 6.1. Diseño de Iniciadores para Amplificación Isotérmica

Se diseñó un conjunto de iniciadores LAMP compuesto por 3 pares de iniciadores específicos que hibridan en la región 5.8S-ITS2 del DNA de *Coccidioides* spp. Las propiedades de los iniciadores y el sitio de hibridación se detallan en el Cuadro 11 y su especificidad fue evaluada *in-silico* utilizando el algoritmo Primer-BLAST, disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos (Ye *et al.*, 2012). Los iniciadores fueron revisados individualmente para potenciales reacciones cruzadas con regiones genómicas de *Homo sapiens* (Taxid: 9806), hongos (Taxid: 4751), bacterias (Taxid: 2), virus (Taxid: 10239) y micobacterias (Taxid: 85007). Los resultados obtenidos del algoritmo BLAST se analizaron en busca de posibles microorganismos asociados a neumonía adquirida en la comunidad y posibles causantes de interferencia en el ensayo LAMP. Las coincidencias con microorganismos no asociados comúnmente a neumonía adquirida en la comunidad en la literatura (Musher y Thorner, 2014), fueron desestimados debido a que no son clínicamente relevantes, al igual que aquellos con uno o más nucleótidos desapareados. Los resultados más probables se muestran en el Cuadro 12.

**Cuadro 11. Propiedades del conjunto de iniciadores LAMP diseñados.**

| **Dimerización (mínimo) ΔG=-2.17** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Ini** | **5'** | **3'** | **Long (nt)** | **Tm** | **5' ΔG** | **3' ΔG** | **%GC** | **Secuencia 5′→3′** | **Región** |
| F3 | 323 | 344 | 22 | 54.5 | -6 | -3.7 | 32 | ATGCGATAAGTAATGTGAATTG | 5.8S |
| B3 | 505 | 521 | 17 | 57.2 | -5.5 | -6 | 59 | GACACCAGGAACTCGGT | ITS2 |
| F2 | 347 | 368 | 22 | 57 | -3.1 | -4.7 | 41 | GAATTCCGTGAATCATCGAATC | 5.8S |
| F1c | 406 | 423 | 18 | 60.2 | -6.4 | -5.9 | 61 | GACGCTCGAACAGGCATG | 5.8S |
| B2 | 486 | 502 | 17 | 57.6 | -7.5 | -4 | 59 | CCGCCACTGCATTTCAG | ITS2 |
| B1c | 433 | 451 | 19 | 61.1 | -4.9 | -4.7 | 58 | CCTTCAAGCACGGCTTGTG | ITS2 |
| LF | 373 | 388 | 16 | 61.4 | -7.9 | -4.2 | 56 | GGCGCAATGTGCGTTC | 5.8S |
| LB | 455 | 470 | 16 | 61.6 | -5.2 | -6.6 | 65 | TGTTGGGCCAACGTCC | ITS2 |

Ini: iniciadores; Long: longitud; Tm: temperatura de hibridación; %GC: porcentaje de Guanina-Citosina.

**Cuadro 12. Posibles interferencias por reacción cruzada**

| Iniciador | Especificidad | Reacción cruzada |
|---|---|---|
| F3 | Sí | No |
| B3 | Sí | No |
| F2 | Sí | No* |
| F1c | No | *Chrysosporium* spp. |
| B2 | Sí | No* |
| B1c | No | *Chrysosporium* spp. |
| LF | Sí | No |
| LB | Sí | No |

*Probable reacción cruzada con *Uncinocarpus reesii*. No obstante, no hay evidencia científica que este hongo cause infección respiratoria en humanos.

Respecto al análisis de especificidad *in-silico*, es necesario notar que *U. reesii* es un hongo de características saprofíticas que pertenece al orden *Onygenales* y que está estrechamente relacionado al género *Coccidioides* (Sharpton *et al.*, 2009). No obstante, hasta la fecha no se han reportado infecciones de ningún tipo en seres humanos. Por otro lado, *Chrysosporium* spp. es un género de hongos saprófitos queratinofílicos que rara vez ocasiona infecciones en humanos y que generalmente ataca a pacientes inmunocomprometidos, pudiendo excepcionalmente generar infecciones invasivas y pulmonares (Roilides *et al.*, 1999; Siddiqui y Zimmerman, 2016; Suankratay *et al.*, 2015; Suchonwanit *et al.*, 2015). Aunque una reacción cruzada con este último microorganismo parece factible, es poco probable, ya que sólo una fracción de un par de iniciadores es complementario con cierta región genómica de *Chrysosporium* spp. No obstante, una vez validado el método LAMP para detección de *Coccidioides* spp, se deberá evaluar la posibilidad de reacción cruzada con éste u otros microorganismos.

## 6.2. Diseño, Clonación y Aislamiento de Control Positivo para LAMP

Se obtuvieron clonas recombinantes de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *C. posadasii* (655 nucleótidos) en el vector pJET1.2 en células *E. coli* TOP10. Las colonias transformadas se muestran en la Figura 1. La transformación efectiva de estas colonias se pone de manifiesto con la

habilidad de la bacteria de crecer en un medio adicionado con ampicilina, ya que el vector pJET1.2 cuenta con una secuencia de resistencia a dicho antibiótico (bla AmpR). Por otra parte, se tiene la seguridad de que estas colonias poseen la secuencia 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S, ya que este vector posee además un gen que expresa una enzima de restricción letal (eco47IR) que mata a la bacteria en el caso de que este se recircularice sin incluir la secuencia de interés (Thermo Scientific, 2015). La presencia de la secuencia de interés se confirmó identificando el amplicón en las 4 colonias seleccionadas mediante análisis en gel de agarosa del producto de PCR de colonia, tal como se muestra en la Figura 2. La región amplificada mostró una longitud aproximada de 775 pb, que coincide con lo esperado de acuerdo con las regiones adicionadas correspondientes al vector pJET1.2, de aproximadamente 120 pb de acuerdo al mapa de vector mostrado por Barnes (2011).

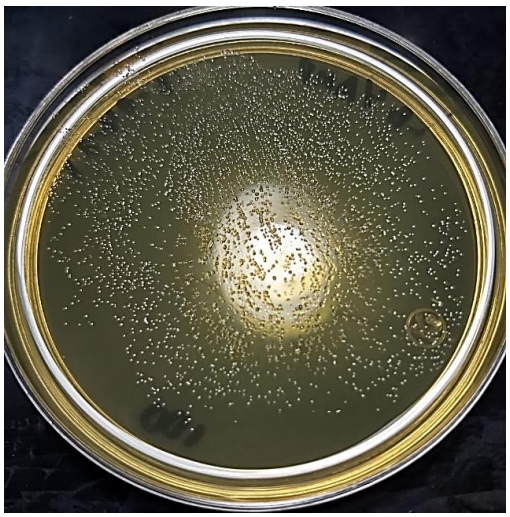


Figura 1. Selección de colonias transformadas en medio LB con ampicilina.

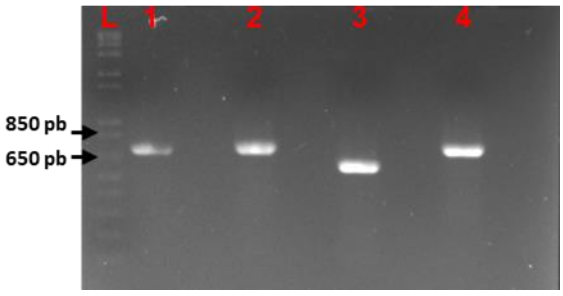



Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la región amplificada mediante PCR de 4 colonias seleccionadas (carriles 1 al 4). Carril L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

La cantidad de DNA plasmídico obtenida de 4 colonias transformadas elegidas para miniprep y posteriormente purificadas se muestran en el Cuadro 13. Las muestras de DNA plasmídico aislado mostraron resultados dentro de lo considerado como puro. Según Desjardins y Conklin (2010), un índice de absorbancia 260/280 de aproximadamente 1.8 para DNA y un índice A260/230 en el intervalo de 1.8 – 2.2, son indicativos de calidad en la muestra. Por lo tanto, éstas se utilizaron para las etapas subsecuentes de este trabajo en donde se utilizó como control positivo. Otros trabajos similares de desarrollo de métodos moleculares para detección de *Coccidioides* spp. han utilizado vectores para diseñar plásmidos sintéticos con el objetivo de usarlos como controles de referencia (Binnicker *et al.*, 2007).

**Cuadro 13. Concentración de DNA plasmídico purificado aislado de colonias transformadas**

| Muestra | Concentración (ng/µL) | 260/280 | 260/230 |
|---|---|---|---|
| Colonia 1 | 212.6 | 2.11 | 2.34 |
| Colonia 2 | 1305 | 2.14 | 2.28 |
| Colonia 3 | 1138.3 | 2.16 | 2.24 |
| Colonia 4 | 4352.7 | 1.88 | 2.10 |

## 6.3. Comprobación de Funcionalidad de Iniciadores para Amplificación Isotérmica

Se realizó inicialmente un panel con un total de 7 reacciones LAMP tanto en el vial con volumen total de 25 µL como por electroforesis en gel de agarosa. La relación de las reacciones se muestra en el Cuadro 4. Los resultados de la tinción en vial con SYBR® Green 20X se muestran en las Figuras 3 y 4. En éstas se puede observar fluorescencia, característica de las reacciones positivas, mientras que el control negativo no muestra fluorescencia. El resultado del análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% se muestra en la Figura 5.

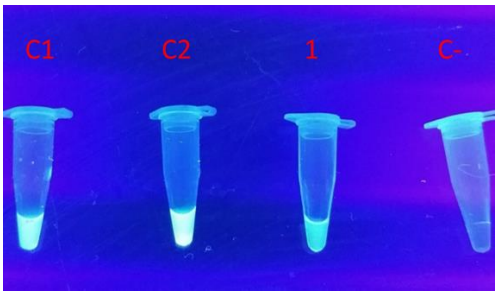



Figura 3. Reacciones LAMP reveladas con SYBR Green 20X (Panel inicial 1). C- = Control de agua con SYBR Green 20X . C1 (sin templado), C2 (10 ng de templado, sin iniciadores F3/B3), 1 (10 ng templado). Ver componentes de reacción en Cuadros 3 y 4.

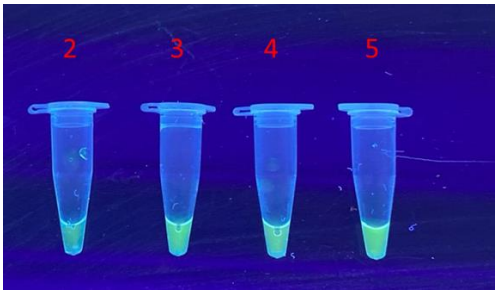



Figura 4. Reacciones LAMP reveladas con SYBR® Green 20X (Panel inicial 2). Diferente cantidad de templado, 2 (25 ng), 3 (50 ng), 4 (75 ng) y 5 (100 ng). Componentes de reacción en Cuadros 3 y 4.

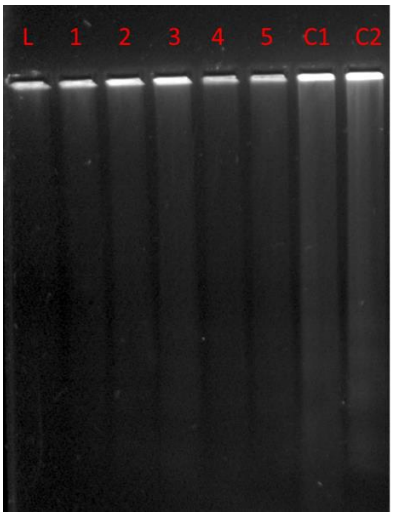



Figura 5. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En las reacciones se ensayaron cantidades variables de templado, carriles 1: 10 ng; 2: 25 ng; 3: 50 ng; 4: 75 ng; y 5: 100 ng. C1: control sin templado y C2: 10 ng sin iniciadores F3/B3. Carril L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

La electroforesis en gel de agarosa muestra patrones de barrido en los carriles con muestra de reacción LAMP. No obstante, dicho patrón también puede observarse en los carriles C1 y C2 (Figura 5). En C2, se esperaba que la reacción tuviera menor eficiencia ya que los iniciadores F3/B3 son externos, cuya función es desplazar la cadena formada en la primera etapa de la reacción LAMP (Notomi *et al.*, 2000). Por otra parte, el carril con C1 muestra fluorescencia y un patrón en forma de escalera (difuso) en el gel de agarosa, lo cual puede significar que los iniciadores están generando productos de amplificación inespecíficos (Meagher *et al.*, 2018). Por esta razón, se decidió montar una batería de reacciones que descartaran esta posibilidad, la cual se observa en el Cuadro 5. Los resultados de estas reacciones se observan en las Figuras 6 y 7 para el panel A.

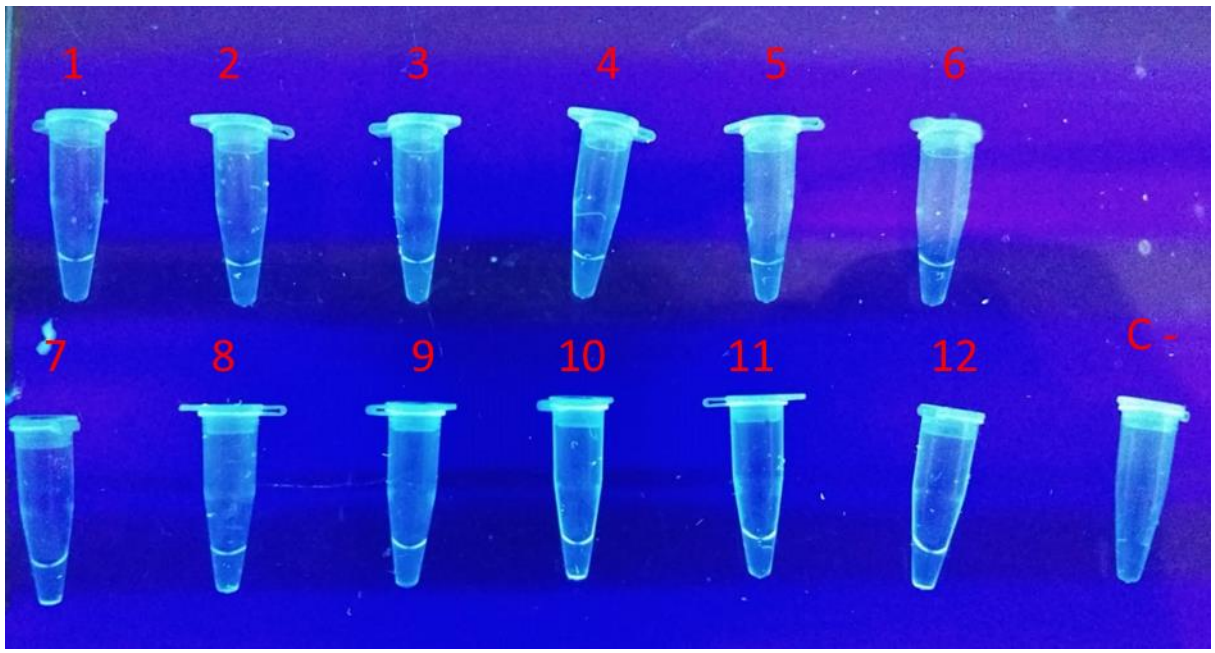



Figura 6. Viales de reacción LAMP con un solo iniciador (Panel A). Tinción con SYBR® Green 20X. C-: 25 µL de agua destilada con 1 µL de SYBR® Green 20X. Ver los componentes de reacciones en Cuadro 3 e iniciadores utilizados en Cuadro 5.

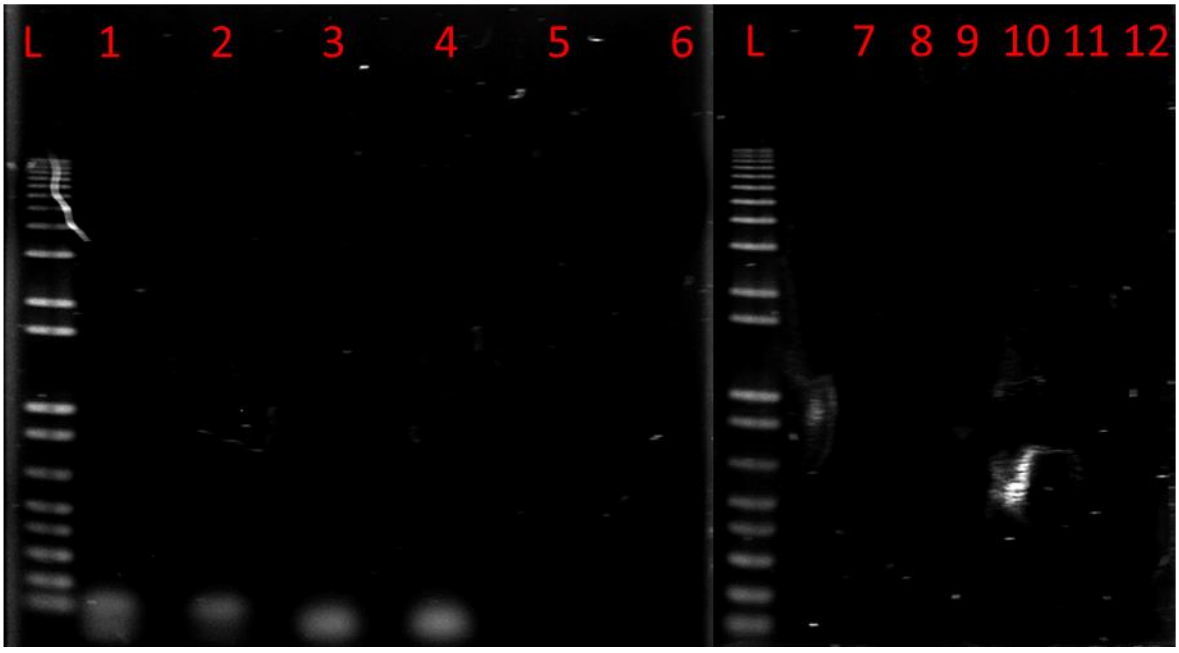


Figura 7. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel A) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: FIP; carriles 3 y 4: BIP; 5 y 6: F3; carriles 7 y 8: B3; carriles 9 y 10: LF; carriles 11 y 12: LB. Las reacciones de carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 contenían 10 ng de templado (+). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

Los resultados de las reacciones LAMP del panel A, sugieren que no hay interacciones intramoleculares autoamplificables en cada uno de los iniciadores sintetizados a condiciones de reacción de 65°C por 50 min. Esto se observa con la ausencia de una franca señal fluorescente en los viales de reacción de la Figura 6 en comparación con las observadas previamente en el panel inicial. Además, no se observaron amplicones en el corrimiento electroforético de la Figura 7. No obstante, puede apreciarse al final del gel una banda que podría corresponder a los iniciadores internos (FIP o BIP). Lo cual para el caso de los carriles 1 y 2 (correspondientes al iniciador FIP), se observa de un tamaño de aproximadamente 100 pb. Mientras que para los carriles 3 y 4 (correspondientes al iniciador BIP), se observan de < 100 pb. Esto sugiere, que los iniciadores FIP pueden estar formando dímeros consigo mismos, aunque no es suficiente para autoamplificarse. Esta posibilidad fue investigada utilizando el software Oligoanalyzer™ de IDT (Coralville, EUA), obteniéndose el resultado del Cuadro 14 como el más probable.

**Cuadro 14. Predicción de dímeros de iniciadores FIP utilizando OligoAnalyzer™.**

| Parámetro | [Final] | ΔG = -8.51 kcal/mol, Bases apareadas: 6 |
|---|---|---|
| Iniciador | 1.6 µM | 5' GACGCTCGAACAGGCATGTTTTGAATTCCGTGAATCATCGAATC |
| $Na^{+}$ | 50 mM | : : : | | | | | : : : |
| $Mg^{+2}$ | 8 mM | 3' CTAAGCTACTAAGTGCCTTAAGTTTTGTACGGACAAGCTCGCAG |
| dNTPs | 10 mM | |

El valor de energía libre Gibbs (ΔG) en estructuras moleculares determina termodinámicamente la posibilidad de que una conformación intra o intermolecular ocurra de manera espontánea. A menor ΔG, ésta se hace más probable. Para el caso de la predicción en el Cuadro 14, el ΔG (-8.51) es muy pequeño, por lo que es muy probable que esta conformación ocurra. Por otra parte, se tienen los resultados del panel B que se muestran en las Figuras 8 y 9. Este panel fue diseñado especialmente para detectar interacción intermolecular entre mezclas de iniciadores.

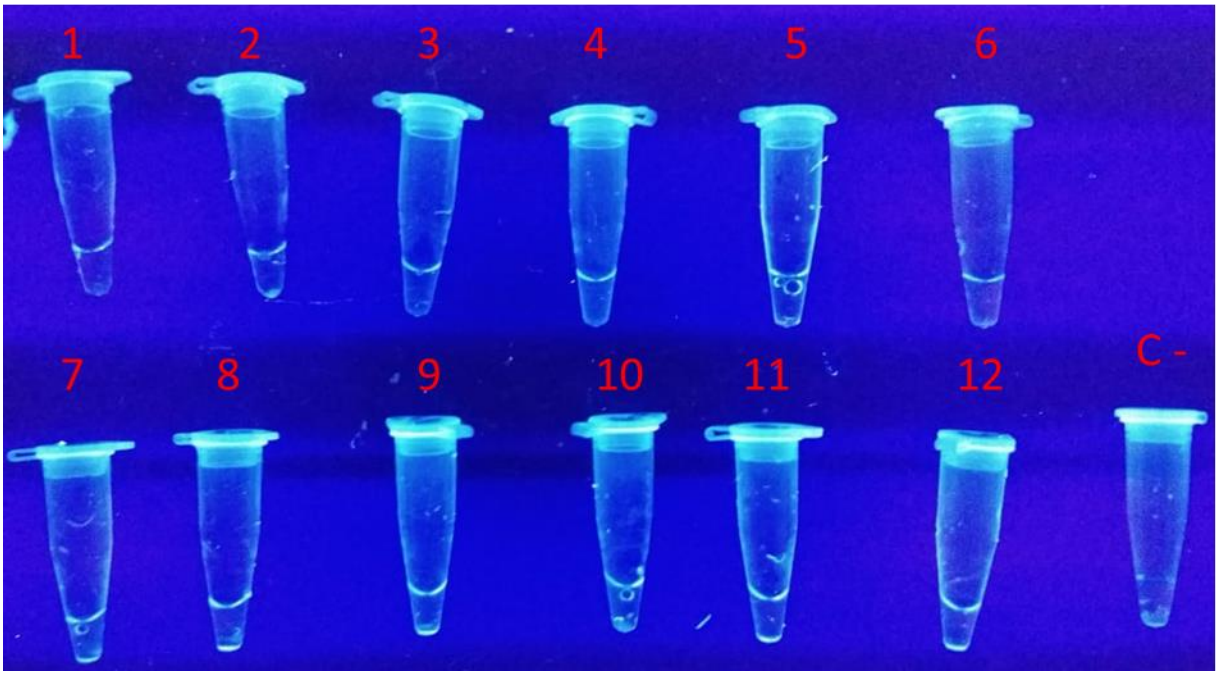



Figura 8. Viales de reacción LAMP con un par de iniciadores (Panel B). Tinción con SYBR® Green 20X. C-: 25 µL de agua destilada con 1 µL de SYBR® Green 20X. Ver componentes de reacciones en Cuadro 3 e iniciadores utilizados en Cuadro 5.

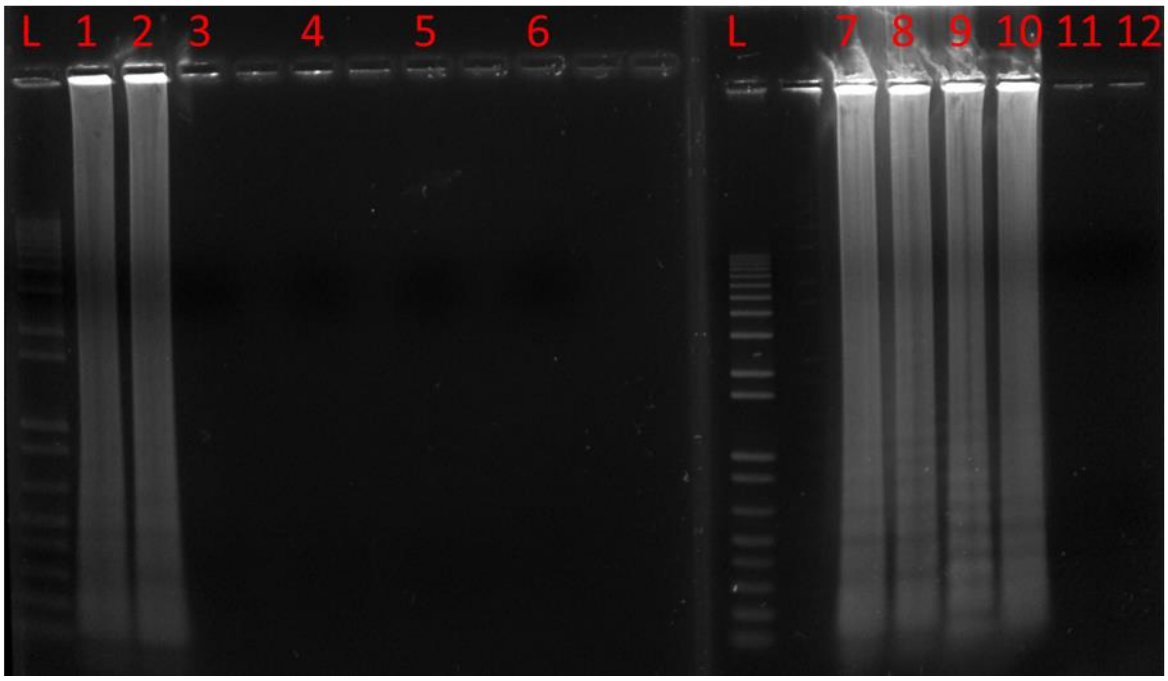


Figura 9. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel B) con un par de iniciadores, por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: FIP/BIP; carriles 3 y 4: F3/B3; carriles 5 y 6: LF/LB; carriles 7 y 8: FIP/BIP + F3/B3; carriles 9 y 10: FIP/BIP + LF/LB; carriles 11 y 12: F3/B3 + LF/LB. Las reacciones de carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 son con 10 ng de templado (+). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

La Figura 8 muestra un panel de viales de reacción teñidos con SYBR® Green 20X, en los cuales no se observa fluorescencia. Esto contrasta con lo observado en la Figura 9 en que se aprecian fácilmente el corrimiento de los amplicones en forma de escalera en los carriles 1, 2, 7, 8, 9 y 10. Se observó que esta discordancia pudo deberse a la degradación de la alícuota de trabajo en uso de SYBR® Green, por lo que se optó por manejar el reactivo en alícuotas de menor volumen (30 µL) y exclusivamente bajo luz roja. El patrón de bandas en forma de escalera observado en el gel de agarosa es típico de las reacciones LAMP positivas, y corresponde presuntivamente al corrimiento de varias estructuras “en forma de coliflor” que contienen la región amplificada “en tándem” y empalmada una con otra (Notomi *et al.*, 2000; Shirato, 2019). El resultado muestra, como en la presencia exclusiva de la mezcla de iniciadores FIP/BIP se obtiene una amplificación de la reacción LAMP, a diferencia del resto de los carriles en que la mezcla de iniciadores internos está ausente y no se observan productos de amplificación. Esto hace pensar en la posibilidad de la dimerización de los iniciadores FIP y BIP que permitan la autoamplificación.

De acuerdo con Meagher *et al.* (2018), la formación de dímeros y horquillas en los iniciadores internos son comunes en este tipo de ensayos debido a que su tamaño es grande (40 – 45 pb) y en ocasiones estos pueden dar lugar a autoamplificación. Este autor, evidencia los efectos de la autodimerización y la formación de horquillas en los iniciadores internos de reacciones LAMP, pero no provee información respecto a la posibilidad de la formación de heterodímeros de iniciadores FIP y BIP. No obstante, esta posibilidad es factible, por lo que se procedió a analizar la interacción entre estos dos iniciadores con el software OligoAnalyzer™, obteniéndose los resultados mostrados en el Cuadro 15. Esta posibilidad de interacción había sido detectada durante el diseño de los iniciadores LAMP utilizando el programa UNAfold de la State University of New York at Albany (Albania, EUA). Sin embargo, según éste, la probabilidad era menor debido a que el ΔG calculado era mayor que el encontrado en esta predicción (-3.4).

**Cuadro 15. Predicción de heterodímeros de iniciadores FIP y BIP utilizando OligoAnalyzer™**

| **Parámetro** | **[Final]** | **ΔG = -9.98 kcal/mol, Bases apareadas: 5** |
|---|---|---|
| Iniciador | 1.6 µM | 5' GACGCTCGAACAGGCATGTTTTGAATTCCGTGAATCATCGAATC |
| $Na^{+}$ | 50 mM | : : : : : : \| \| \| \|\| : : : |
| $Mg^{+2}$ | 8 mM | 3' GACTTTACGTCACCGCCTTTTGTGTTCGGCACGAACTTCC |
| dNTPs | 10 mM | |

## 6.4. Determinación de Condiciones Óptimas de Reacción

En virtud de lo encontrado durante la comprobación de la funcionalidad de los iniciadores, se decidió elevar la temperatura de reacción a 68°C continuando con un tiempo de 50 min en las siguientes reacciones. Esto se realizó buscando alejarse de la probable Tm de estructuras secundarias en los iniciadores internos.

### 6.4.1. Determinación de Concentración Óptima de Iniciadores Internos (FIP/BIP)

La optimización de la concentración de iniciadores internos fue motivada debido tanto a los falsos positivos encontrados en los paneles inicial y B (Figuras 5 y 9), como por la evidencia de dichos iniciadores al final del gel electroforesis del panel A (Figura 7), que sugiere un exceso de concentración. Debido a esto, se desarrollaron los paneles C y D, mostrados previamente en el Cuadro 6. Los resultados de las reacciones LAMP del panel C se muestran en las Figuras 10 y 11, mientras que las del panel D se muestran en las Figuras 12 y 13. Los resultados de estas reacciones sugieren que, a menor concentración, se obtienen menos falsos positivos. Esto puede apreciarse fácilmente con la diferencia en la concentración del amplicón en los carriles 5 y 6, tanto en el panel C como en el panel D. Por esta razón, se decidió continuar trabajando con los iniciadores FIP/BIP en una mezcla con concentración de 2.5 µM cada uno.

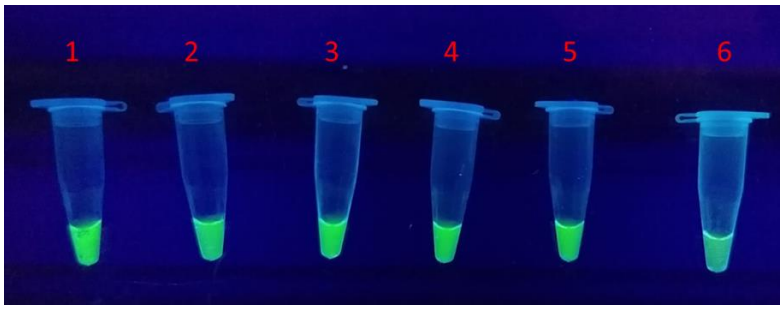



Figura 10. Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel C). Tinción con SYBR® Green 20X. Concentración de iniciadores en Cuadro 6.

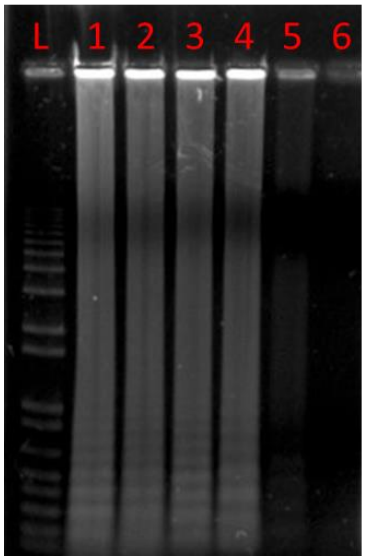



Figura 11. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel C) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: FIP/BIP 20 µM; carriles 3 y 4: FIP/BIP 10 µM; carriles 5 y 6: FIP/BIP 5 µM. Las reacciones de carriles 1, 3 y 5 contenían 10 ng de templado (+). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

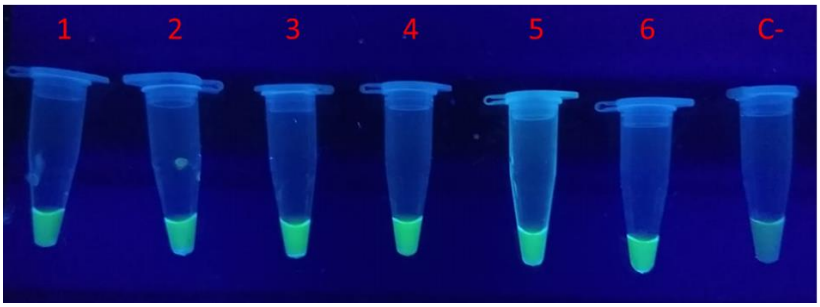



Figura 12. Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel D). Tinción con SYBR® Green 20X. C-: vial de reacción con 10 ng de templado y FIP/BIP 5 µM (sin incubación). Concentración de iniciadores ver en Cuadro 6.

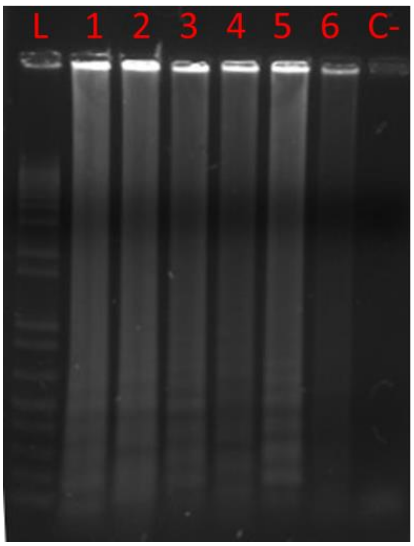



Figura 13. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel D) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: FIP/BIP 10 µM; carriles 3 y 4: FIP/BIP 5 µM; carriles 5 y 6: 2.5 µM. Las reacciones de carriles 1, 3 y 5 contenían 10 ng de templado (+). C-: vial de reacción con 10 ng de templado y FIP/BIP 5 µM (sin incubación de la reacción). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

### 6.4.2. Determinación de Dilución Óptima de SYBR® Green I

La determinación de la dilución de SYBR® Green adecuada para las reacciones LAMP se llevó a cabo debido a la observación de que, en ocasiones, el resultado de la tinción de los viales no coincidía con lo observado en el corrimiento electroforético de los mismos productos de amplificación. Para esto se ejecutó el Panel E, tal como se encuentra esbozado en el Cuadro 7. Los resultados de estas reacciones (Figuras 14 y 15) sugieren que la fluorescencia de SYBR® Green I a 302 nm, deja de ser evidente después de la dilución 10X. Por lo que esta dilución se continuó utilizando en los siguientes experimentos.

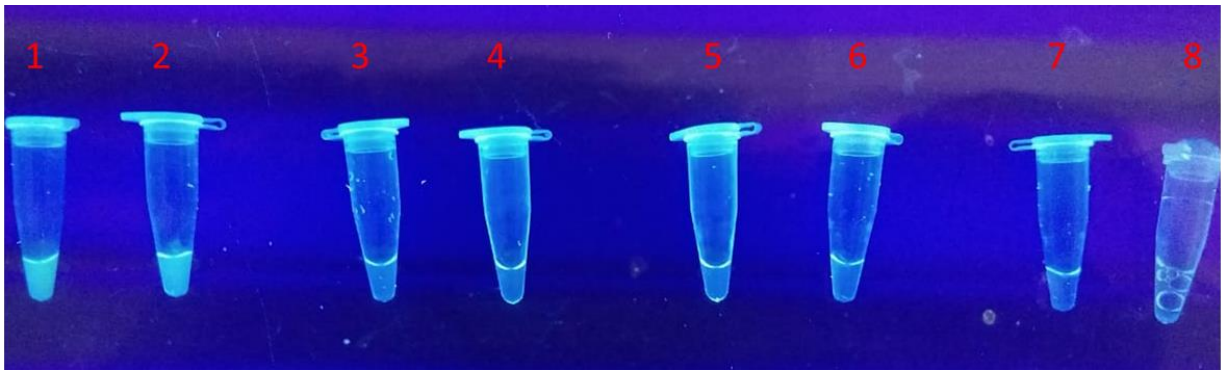


Figura 14. Viales de reacción LAMP para determinación de dilución óptima de SYBR® Green I (Panel E). Condiciones de reacción: 68°C/50min. Concentración de FIP/BIP 2.5 µM.

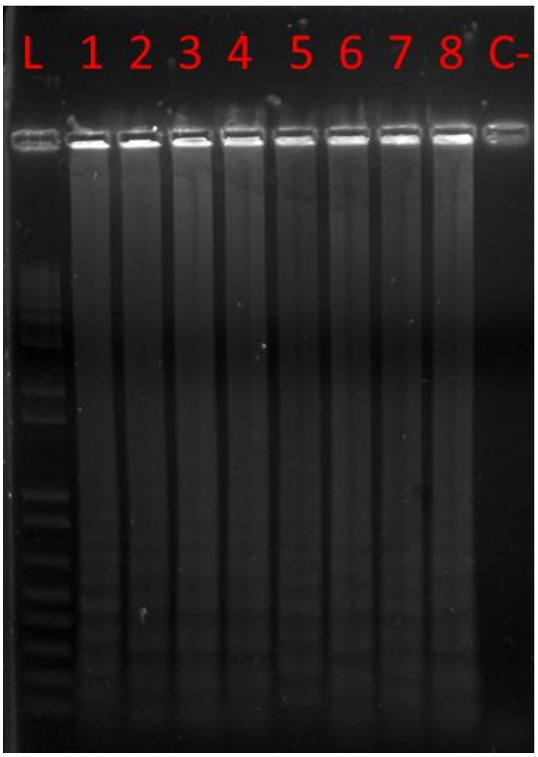


Figura 15. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel E) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: SYBR® Green 10X; carriles 3 y 4: SYBR® Green 5X; carriles 5 y 6: SYBR® Green 2.5X; carriles 7 y 8: SYBR® Green 1X. Las reacciones de carriles 1, 3, 5 y 7 contenían 10 ng de templado (+). C-: vial de reacción completo con 1 µL de templado (10 ng), FIP/BIP 2.5 µM y teñido con SYBR® Green 20X (sin incubación). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

### 6.4.3. Determinación de Tiempo de Reacción Óptimo

Se realizaron pruebas para determinar el tiempo óptimo del ensayo LAMP, para lo cual se utilizó el panel F que se mostró anteriormente en el Cuadro 8. Esto se realizó tomando en cuenta que algunos ensayos LAMP, muestran amplificación suficiente para discriminar positivos de negativos en un tiempo menor a 1 hora. Por ejemplo, Woźniakowski *et al.* (2012) diseñaron un ensayo LAMP para detección de circovirus de ganso, cuyo tiempo óptimo de reacción fue de 30 min. Por otra parte, la variable tiempo de reacción podría ser determinante en la aparición de resultados falsos positivos. Los resultados del panel F de reacciones LAMP se muestran en las Figuras 16 y 17. En éstos, en las reacciones 1 y 2, puede observarse una diferencia entre la fluorescencia de los viales positivo y negativo. Mientras que en el corrimiento electroforético, se observa mejor discriminación conforme se reduce el tiempo de reacción. El tiempo de reacción de 30 min demostró ser tiempo suficiente para evidenciar los viales de las reacciones que contienen DNA plasmídico como templado.

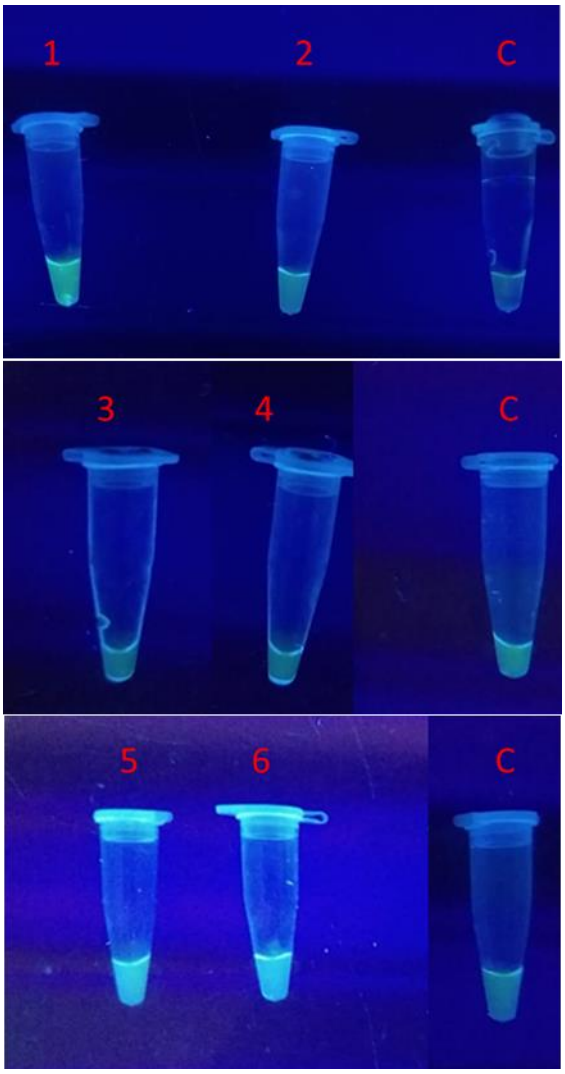



Figura 16. Viales de reacción LAMP para determinación de concentración óptima de iniciadores internos (Panel F). Temperatura de reacción: 68°C. Concentración de FIP/BIP: 2.5 µM. Tinción con SYBR® Green 10X. C: vial de reacción completo con 1 µL de templado (10 ng/µL), FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación). Los tiempos de reacción para reacciones 1 y 2, 30 minutos; reacciones 3 y 4, 40 minutos y reacciones 5 y 6, 50 minutos.

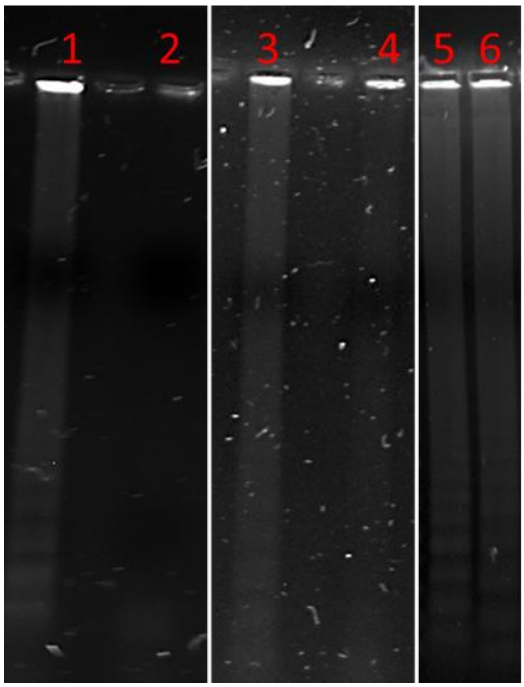



Figura 17. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel F) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: 30 min; carriles 3 y 4: 40 min; carriles 5 y 6: 50 min. Las reacciones de carriles 1, 3 y 5 contenían 10 ng de templado (+). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

### 6.4.4. Determinación de Temperatura de Reacción Óptima

La temperatura de reacción es probablemente una de las condiciones de reacción más determinante para la formación de una estructura secundaria. Debido a esto, se llevaron a cabo la serie de reacciones LAMP que se plantearon en el Cuadro 9 y que se denominó panel G. Los resultados de estas reacciones se pueden observar en las Figuras 18 y 19. Estas reacciones evidencian el efecto del cambio de temperatura en el ensayo LAMP, en el cual puede observarse que, al aumentar la temperatura las muestras adicionales con el control positivo se muestran como negativas. Esto puede interpretarse, como un aumento en los falsos negativos, lo cual puede deberse a la inhibición de la enzima DNA polimerasa Bst 2.0 WarmStart®. Según el proveedor (New England Biolabs, Inc.), la temperatura óptima de la enzima se encuentra entre 60 – 70°C. Mientras que temperaturas mayores podrían reducir la actividad de la reacción (New England Biolabs Inc., 2021). Otros trabajos con enzimas similares, han encontrado una franca inhibición de la reacción LAMP por encima de los 68°C (Woźniakowski *et al.*, 2012), lo que coincide con lo observado en este trabajo.

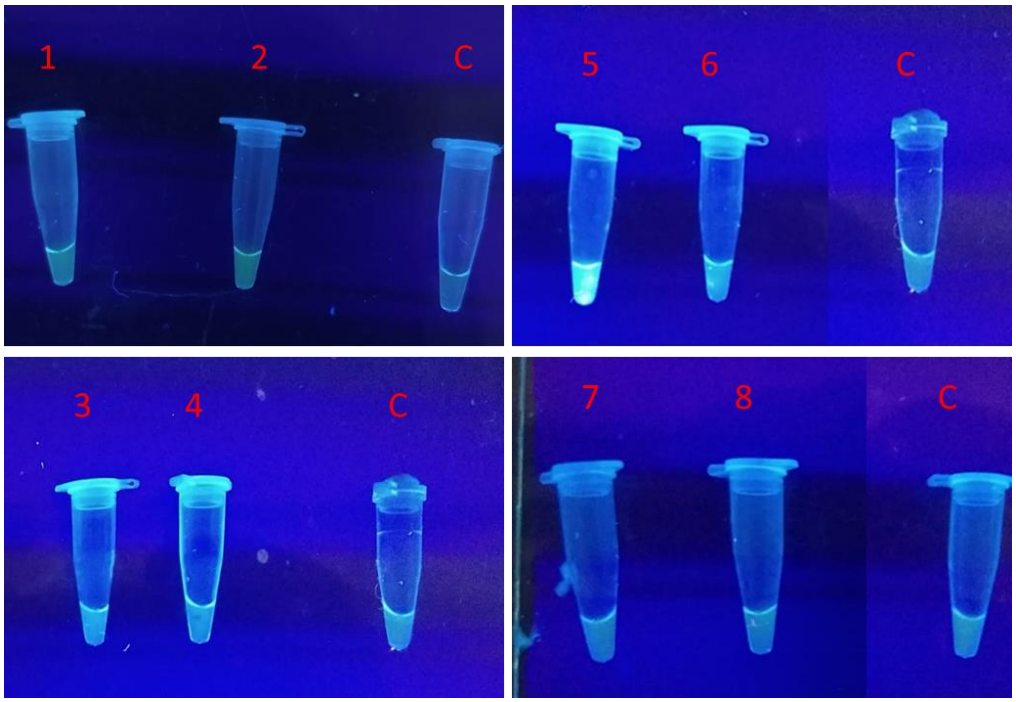



Figura 18. Viales de reacción LAMP para determinación de temperatura de reacción óptima (Panel G). Tiempo de reacción: 30 min. Concentración de FIP/BIP: 2.5 µM. Tinción con SYBR® Green 10X. C: vial de reacción con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y SYBR® Green 10X (sin incubación).

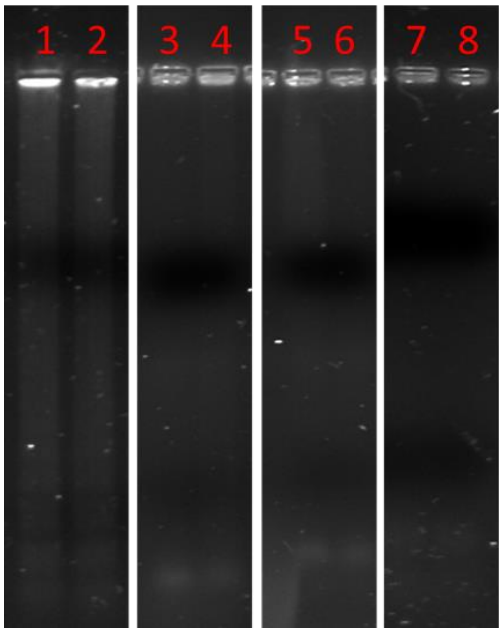



Figura 19. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel G) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: 65°C; carriles 3 y 4: 66.5°C; carriles 5 y 6: 67°C; carriles 7 y 8: 68°C. Las reacciones de carriles 1, 3, 5 y 7 contenían 10 ng de templado (+), las demás reacciones sin templado. Tinción con GelRed® 2X.

### 6.4.5. Pruebas con Condiciones Intermedias de Temperatura y Tiempo

Debido a las observaciones previamente realizadas, sobre el efecto de las variables temperatura y tiempo de reacción en el ensayo LAMP; se decidió realizar una batería de reacciones denominada panel H (Cuadro 10), que se subdividió en tres partes por practicidad. Se partió de la premisa de que a mayor temperatura más falsos negativos, mientras que a menor tiempo de reacción menos falsos positivos. Por esta razón, se decidió buscar condiciones intermedias entre ambas variables, habiendo previamente determinado la concentración de iniciadores internos y dilución de SYBR® Green óptimas para este ensayo LAMP. Los resultados de esta batería de reacciones se muestran en las Figuras 20 y 21, para el panel H-1; Figuras 22 y 23, para el panel H-2, y Figuras 24 y 25, para el panel H-3.

Las reacciones del panel H-1 muestran como la reacción con condiciones de 68°C/40 min, logró discriminar correctamente entre positivo y negativo en el gel de electroforesis (carriles 3 y 4, Figura 21). Sin embargo, esta diferencia no se alcanza a apreciar bien con la fluorescencia del vial de reacción (Figura 20). En el panel H-2, las condiciones de reacción que lograron discriminar correctamente entre positivo y negativo en el corrimiento electroforético, fueron 66.5°C/40min (carriles 1 y 2, Figura 23). Sin embargo, aunque la discriminación con la fluorescencia en el vial es correcta, se distingue muy pobremente entre positivo y negativo (Figura 22). En el mismo panel, se observa una fluorescencia intensa en el vial 3 de la Figura 22, que contrasta con lo observado en el corrimiento electroforético (carriles 3 y 4, Figura 23) en el que no se observa amplicón con forma de escalera. Este resultado no ha podido ser explicado. En cuanto a las reacciones del panel H-3, las condiciones de reacción con mejor desempeño en el corrimiento electroforético fueron 65°C/30 min (carriles 1 y 2, Figura 25). No obstante, ambas se observan positivas mediante la apreciación de la fluorescencia en el vial de reacción (Figura 24).

Por otro lado, las reacciones del panel H-3 se tiñeron también con GelRed® 40X, con el objetivo de probar el desempeño de esta tinción en el vial, en comparación con SYBR® Green. Otros autores como Woźniakowski *et al.* (2012), lograron una discriminación correcta, utilizando GelRed® 1000X. No obstante, en este ensayo LAMP y con la dilución de 40X, no fue posible discriminar positivos de negativos en el vial de reacción utilizando la tinción de GelRed® (Figuras 26 y 27).

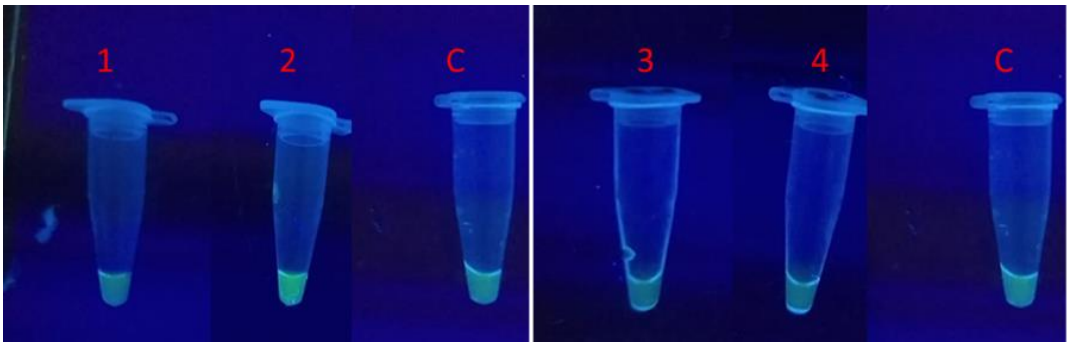



Figura 20. Viales de reacción LAMP para pruebas de condiciones intermedias entre variables temperatura y tiempo de reacción (Panel H-1). Concentración de FIP/BIP: 2.5 µM. Tinción con SYBR® Green 10X. C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación).

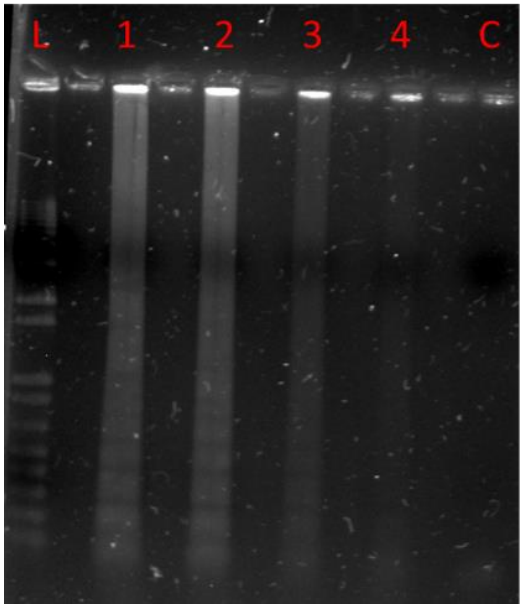



Figura 21. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel H-1) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: 66.5°C/50 min; carriles 3 y 4: 68°C/40 min. Las reacciones de carriles 1 y 3 contenían 10 ng de templado (+). C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

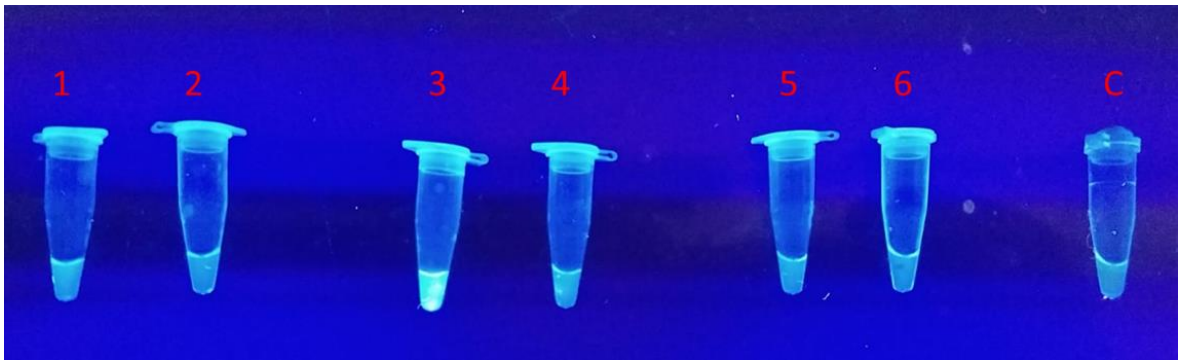



Figura 22. Viales de reacción LAMP para pruebas de condiciones intermedias entre variables temperatura y tiempo de reacción (Panel H-2). Concentración de FIP/BIP: 2.5 µM. Tinción con SYBR® Green 10X. C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación).

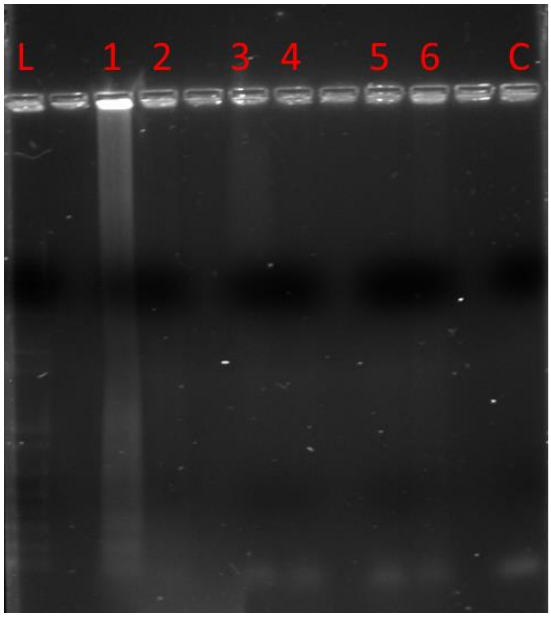



Figura 23. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel H-2) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: 66.5°C/40 min; carriles 3 y 4: 67°C/30 min; carriles 5 y 6: 66.5°C/30 min. Las reacciones de carriles 1, 3 y 5 contenían 10 ng de templado (+). C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

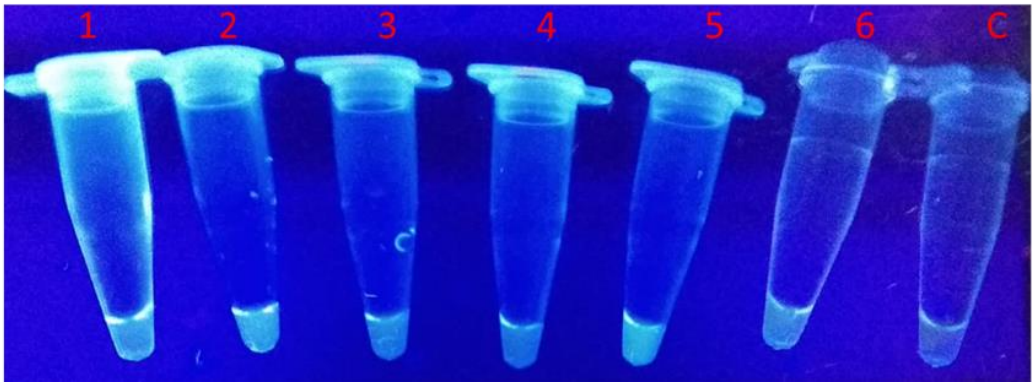



Figura 24. Viales de reacción LAMP para pruebas de condiciones intermedias entre variables temperatura y tiempo de reacción (Panel H-3). Concentración de FIP/BIP: 2.5 µM. Tinción con SYBR® Green 10X. C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación).

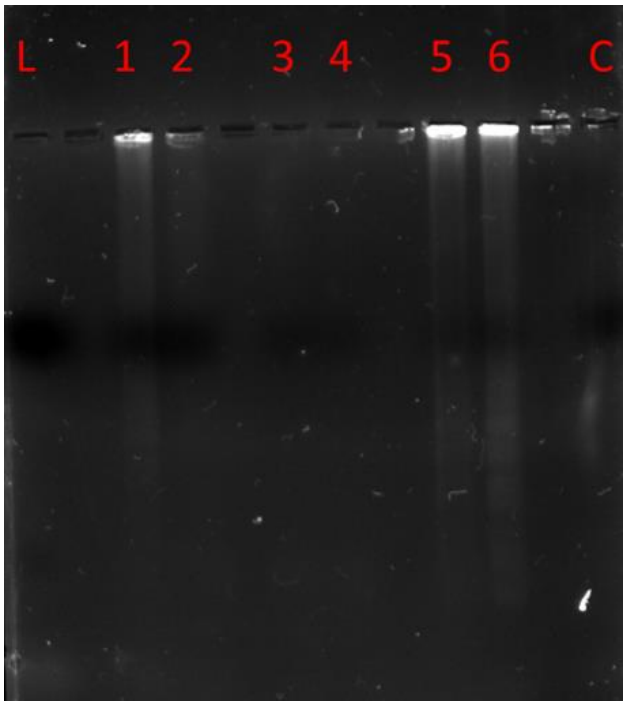



Figura 25. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP (Panel H-3) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: 65°C/30 min; carriles 3 y 4: 70°C/30 min; carriles 5 y 6: 66.5°C/40 min. Las reacciones de carriles 1, 3 y 5 contenían 10 ng de templado (+). C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos con SYBR® Green 10X (sin incubación). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

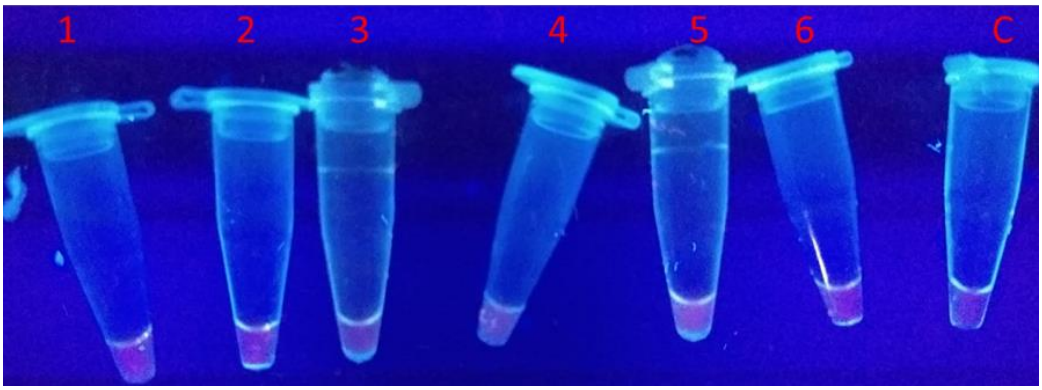



Figura 26. Viales de reacción LAMP para pruebas de tinción con GelRed® 40X (Panel H-3). Concentración de FIP/BIP: 2.5 µM. C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos GelRed® 40X.

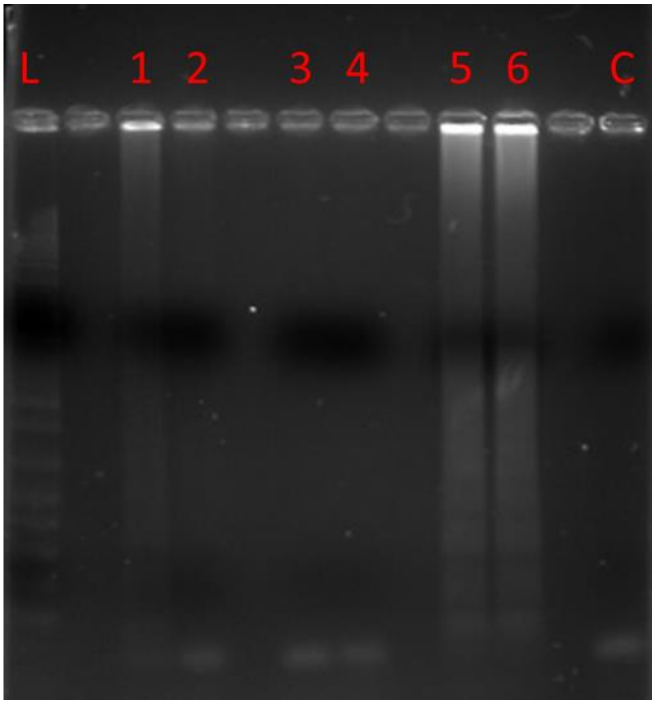



Figura 27. Análisis de productos de amplificación de reacciones LAMP teñidas con GelRed® 40X antes de la corrida (Panel H-3) por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles 1 y 2: 65°C/30 min; carriles 3 y 4: 70°C/30 min; carriles 5 y 6: 66.5°C/40 min. Las reacciones de carriles 1, 3 y 5 contenían 10 ng de templado (+). C: vial de reacción completo con 10 ng de templado, FIP/BIP 2.5 µM y teñidos previamente con GelRed® 40X (sin incubación). L: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder). Tinción con GelRed® 2X.

Para concluir esta sección, es importante poner especial atención a la presencia de falsos positivos observados experimentalmente utilizando el par de iniciadores FIP/BIP. Es necesario tomar en

cuenta las simulaciones *in-silico* obtenidas utilizando el software OligoAnalyzer™, las cuales mostraron dos estructuras diméricas posibles: 1) homodímeros del iniciador FIP, y 2) heterodímeros de iniciadores FIP/BIP. La formación de una o ambas estructuras pudo haber contribuido a la amplificación inespecífica del presente ensayo LAMP para *Coccidioides* spp., por lo que se hace necesaria la eliminación o modificación de potenciales regiones complementarias entre sí en estos iniciadores.

Según Meagher *et al.* (2018), la modificación de los iniciadores largos, de manera que se elimine la región que puede formar estructuras secundarias, puede "salvar" los iniciadores, de manera que se reduzca la amplificación inespecífica y mejore la eficiencia de la reacción. En los análisis *in-silico* utilizando OligoAnalyzer™ de IDT se obtuvo que las regiones más probables para empalmarse y formar un dímero se encuentran en F2. De hecho, las dos regiones para el homodímero de FIP y el heterodímero FIP/BIP se encuentran contiguas, por lo que retirar un total de 6 nucleótidos a partir del extremo 5´ del iniciador F2 (5´-GAATTCC-3´), podría disminuir la superficie de contacto tanto entre los oligonucleótidos. Como resultado, la región F2 quedaría con 15 nucleótidos y se disminuiría la probabilidad de generar estructuras secundarias que pudieran autoamplificarse.

Otro punto importante por tomar en cuenta para este proyecto es el de secuenciar la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S clonada en plásmido pJET1.2, para corroborar que la secuencia utilizada en los ensayos LAMP es la región blanco de interés. Dicha secuenciación está actualmente en proceso y se espera tener el resultado próximamente. No obstante, la PCR de colonia realizada en este trabajo nos da evidencia al respecto y podemos validar hasta cierto punto su uso como control positivo. Por otra parte, evaluar la especificidad de los actuales iniciadores en las reacciones efectivamente positivas y en las falsas positivas, podría ayudar a explicar en parte los hallazgos obtenidos. Esto se puede realizar utilizando enzimas de restricción que realicen una serie de cortes en regiones definidas (Shirato, 2019). De esta manera, utilizando el mapa de la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *C. posadasii* se puede determinar cuántos amplicones se producirán y de qué longitud.

Finalmente, existen potenciadores y aditivos que mejoran la eficiencia de reacción y disminuyen la posibilidad de formación de estructura secundarias en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Un reactivo comúnmente utilizado en los viales de reacción LAMP con este fin es la betaína. Según la literatura, la betaína reduce las interacciones por apilamiento de bases, lo que

previene la formación de estructuras secundarias en regiones ricas en GC (Henke *et al.*, 1997). Este efecto se ha observado a una concentración aproximada de 0.8 M en viales de reacción de LAMP con volumen de 25 µL. No obstante, existen opiniones encontradas, aunque esto puede deberse a la diferencia en el contenido de GC de los iniciadores utilizados en estos trabajos (Foo *et al.*, 2020; Noden *et al.*, 2018; Ranjbar y Afshar, 2015; Zhou *et al.*, 2014). En los iniciadores utilizados en el presente estudio, las regiones con mayor contenido de GC, fueron F1c y LB (61% y 65%, respectivamente). No obstante, podría valer la pena realizar este experimento para mejorar la especificidad del ensayo. De hecho, la combinación de estos cuatro abordajes podría contribuir a mejorar la eficiencia de la reacción eliminando los falsos positivos y garantizando la especificidad del ensayo LAMP.

# 7. CONCLUSIONES

Se logró diseñar, clonar y aislar exitosamente un plásmido recombinante con la secuencia insertada del rDNA 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S (655 pb) de *C. posadasii*. El DNA plasmídico sintético pudo utilizarse de manera adecuada como control positivo en un ensayo LAMP para la detección de dicha región genómica. Por otra parte, se lograron diseñar tres pares de iniciadores LAMP que hibridaban en la región 5.8S-ITS2 de *Coccidioides* spp. y que demostraron especificidad aceptable en el análisis *in-silico* para la detección de este hongo. No obstante, el proceso de validación de la funcionalidad de este conjunto de iniciadores mostró dificultades para distinguir las reacciones con presencia del DNA plasmídico sintético de aquellas reacciones en que estaba ausente. Por lo que la especificidad de este ensayo LAMP para detección de *Coccidioides* spp. podría estar comprometida.

En vista de lo anterior, se considera imprescindible evaluar extensivamente y excluir la posibilidad de la amplificación de productos inespecíficos en el ensayo LAMP desarrollado en este trabajo. Esta posibilidad, podría conllevar a la generación de resultados falsos positivos y, por tanto, a una pobre discriminación de la presencia de *Coccidioides* spp en muestras biológicas en la práctica clínica. En este trabajo, se observó experimentalmente una limitada capacidad del ensayo LAMP para discriminar positivos y negativos, particularmente al agregar el par de iniciadores FIP/BIP. Las simulaciones *in-silico* mostraron la posibilidad de formación de estructuras secundarias entre estos iniciadores.

Finalmente, a pesar de esta adversidad se logró identificar que este ensayo LAMP diseñado para detectar la región 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S de *C. posadasii* insertada en un plásmido sintético, puede lograr la amplificación detectable en un tiempo mínimo de 30 minutos. Este tiempo de reacción, además mostró menos falsos positivos, por lo que se consideró como el tiempo de reacción óptimo. Así mismo, se detectó que la temperatura óptima de reacción LAMP utilizando la enzima DNA polimerasa BST 2.0 WarmStart® fue de 65°C y que, por encima de esta temperatura, aumenta la posibilidad de falsos negativos. Además, se determinó que la concentración adecuada para trabajar los iniciadores internos FIP/BIP diseñados para este ensayo fue de 2.5 µM y que, por encima de esta concentración, el exceso de estos iniciadores puede estar contribuyendo a la generación de falsos positivos. Con respecto a la tinción adecuada para los viales

de reacción LAMP, se observó que el SYBR® Green I a concentración mínima de 10X tiene mayor poder de discriminación que el GelRed® a 40X.

A pesar de que la hipótesis de este trabajo se cumple parcialmente, debido a que el ensayo LAMP diseñado tiene escasa capacidad de discriminación entre positivos y negativos, los resultados son alentadores para continuar desarrollando este ensayo. Esto debido a que el método LAMP, demostró tener resultados en un tiempo corto, a una misma temperatura y con relativa sencillez, además de utilizar reactivos en cantidades mínimas en comparación con otros métodos como PCR de punto final y PCR en Tiempo-Real. La continuación del desarrollo de este método deberá incluir la modificación de los iniciadores FIP/BIP o el diseño de iniciadores nuevos, pero sin duda promete un ensayo sensible, específico, fácil de ejecutar y de bajo costo que podrá ser ejecutado en laboratorios con acceso limitado a equipos sofisticados de alto presupuesto.

## 8. REFERENCIAS


Actor, J.K. 2012. Adaptive Immune Response and Hypersensitivity. En Actor, J.K. (Ed.), Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. Elsevier Saunders. Philadelphia, Estados Unidos. 53–59 pp.

Al-daraji W.I., Al-mahmoud R.M.W. y Ali M.A. 2009. Case Report Disseminated Coccidioidomycosis A Case Report from the United Kingdom. International Journal of Clinical Experimental Pathology. 2:494–497.

Álvarez-Pérez, S., García M.E. y Blanco J.L. 2008. Diagnóstico micológico: algo está cambiando. Enferm Infecc Microbiol Clin, 26(10):638–646.

American Society for Microbiology. 2015. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. Onceava edición. 2571 pp.

Ampel N.M., Dols C.L. y Galgiani J.N. 1993. Coccidioidomycosis during human immunodeficiency virus infection: results of a prospective study in a coccidioidal endemic area. The American Journal of Medicine. 94(3):235–240.

Ampel N.M. y Hoover S.E. 2015. Pathogenesis of Coccidioidomycosis. Current Fungal Infection Reports, 9(4):253–258.

Arenas-Guzmán, R. 2011. Micología médica ilustrada. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. Cuarta edición. México, D.F. 436 pp.

Arizona Department of Health Services. (2014). *Valley Fever 2014 Annual Report*. Arizona Department of Health Services, Phoenix, AZ. https://www.azdhs.gov/documents/preparedness/epidemiology-disease-control/valley-fever/reports/valley-fever-2014.pdf

Barnes E.S. 2011. Detection and characterization of viral cDNAs amplified from cells. (Tesis de Maestría). The Pennsylvania State University. Spring Grove, EUA.

Baron E.J. y Miller, J.M. 2008. Bacterial and fungal infections among diagnostic laboratory workers: evaluating the risks. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 60(3):241–246.

Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R. y Von Stetten, F. 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence-specific detection. Analytical Methods. 12(6):717–746.

Bergstrom L., Yocum D.E., Ampel N.M., Villanueva I., Lisse J., Gluck O., Tesser J., Posever J., Miller M., Araujo J., Kageyama D. M., Berry M., Karl L. y Yung C.M. 2004. Increased risk of coccidioidomycosis in patients treated with tumor necrosis factor α antagonists. Arthritis and Rheumatism. 50(6):1959–1966.

Bialek R., Kern J., Herrmann T., Tijerina R., Ceceñas L., Reischl U. y González G.M. 2004. PCR Assays for Identification of Coccidioides posadasii Based on the Nucleotide Sequence of the Antigen 2/Proline-Rich Antigen. Journal of Clinical Microbiology. 42(2):778–783.

Binnicker M.J., Buckwalter S.P., Eisberner J.J., Stewart R.A., McCullough A.E., Wohlfiel S.L., y

Wengenack N.L. 2007. Detection of Coccidioides species in clinical specimens by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 45(1):173–178.

Blair J.E. y Logan J.L. 2001. Coccidioidomycosis in Solid Organ Transplantation. Clinical Infectious Diseases. 33(9):1536–1544.

Boehme. C.C., Nabeta P., Henostroza G., Raqib R., Rahim Z., Gerhardt M., Sanga E., Hoelscher M., Notomi T., Hase T. y Perkins, M.D. 2007. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. Journal of Clinical Microbiology. 45(6):1936–1940.

Bonifaz, A. 2012. Micología médica básica. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. Cuarta edición. México, D.F. 436 pp.

Brown J., Benedict K., Park B.J. y Thompson G.R. 2013. Coccidioidomycosis: Epidemiology. Clinical Epidemiology. 5(1):185–197.

Bruns T.D. y Shefferson R.P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: Recent advances and future directions. Canadian Journal of Botany. 82(8):1122–1132.

Castañón-Olivares L.R., Güereña-Elizalde D., González-Martínez M.R., Licea-Navarro A.F., González-González G.M. y Aroch-Calderón A. 2007. Molecular identification of Coccidioides isolates from Mexican patients. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:326–335.

Chiller T.M., Galgiani J.N. y Stevens D.A. 2003. Coccidioidomycosis. Infectious Disease Clinics of North America. 17(1):41–57.

Clemons K.V., Capilla J. y Stevens D.A. 2007. Experimental animal models of coccidioidomycosis. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:208–224.

Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. EP12A2 - User protocol for evaluation of qualitative test performance. Documento CLSI EP12A2. 28(3):1-46

Cohen I.M. 1982. Coccidioidomycosis in renal replacement therapy. Archives of Internal Medicine. 142(3):489–494.

Cole G.T., Seshan K.R., Franco M., Bukownik E., Sun S.H. y Hearn V.M. 1988. Isolation and morphology of an immunoreactive outer wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. Infection and Immunity. 56(10):2686–2694.

Converse J.L. 1956. Effect of physico-chemical environment of spherulation of *Coccidioides immitis* in a chemically defined medium. Journal of Bacteriology. 72(6):784–792.

Converse J.L., Lowe E.P., Castleberry M.W., Blundell G.P. y Besemer A.R. 1962. Pathogenesis of *Coccidioides immitis* in monkeys. Journal of Bacteriology. 83:871–878.

Corpolongo A., Giancola M.L., Ghirga P., Oliva A., Mencarini P., Pane S., Bellagamba R., Tommasi C., Antinori A. y Nicastri E. 2014. An imported case of acute pulmonary coccidioidomycosis in an Italian traveller. Infection. 45(5):921-924.

Cox R.A. y Magee D.M. 2004. Coccidioidomycosis: Host Response and Vaccine Development. 17(4):804–839.

Crum N.F. y Ballon-Landa G. 2006. Coccidioidomycosis in Pregnancy: Case Report and Review of the Literature. American Journal of Medicine. 119(11):11–17.

Cuomo C.A. 2017. Harnessing Whole Genome Sequencing in Medical Mycology. Current Fungal Infection Reports. 11(2):52–59.

Desjardins C.A., Champion M.D., Holder J.W., Muszewska A., Goldberg J., Bailão, A.M., Brigido M.M., da Silva Ferreira M.E., Garcia, A.M., Grynberg M., Gujja S., Heiman D.I., Henn M.R., Kodira C.D., León-Narváez H., Longo L.V.G., Ma L.J., Malavazi I., Matsuo A. L., Morais F.V., Pereira M., Rodríguez-Brito S., Sakthikumar S., Salem-Izacc, S.M., Sykes, Sean M., Teixeira, M.M., Vallejo M.C., Machado Telles Walter M.E., Yandava C., Young, S., Zeng, Q., Zucker J., Felipe, M.S., Goldman G.H., Haas B.J., McEwen J.G., Nino-Vega G., Puccia R., San-Blas G., Almeida de Soares C.M., Birren B.W. y Cuomo C.A. 2011. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. PLoS Genetics. 7(10):e1002345.

Desjardins P. y Conklin D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. Journal of Visualized Experiments. 45:e2565.

Direccion General de Informacion en Salud. 2019. Gasto en Salud en el Sistema Nacional de Salud. Secretaría de Salud. http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinais/gastoensalud_gobmx.html

DiTomasso J.P., Ampel N.M., Sobonya R.E., y Bloom, J.W. 1994. Bronchoscopic diagnosis of pulmonary coccidioidomycosis comparison of cytology, culture, and transbronchial biopsy. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 18(2):83–87.

Donovan F.M., Zangeneh T.T., Malo J., y Galgiani J.N. (2017). Top Questions in the Diagnosis and Treatment of Coccidioidomycosis. Open Forum Infectious Diseases. 4(4):1–4

Duarte-Escalante E., Frías-De-León M. G., Zúñiga G., Martínez-Herrera E., Acosta-Altamirano G. y Reyes-Montes, M. del R. 2014. Molecular markers in the epidemiology and diagnosis of coccidioidomycosis. Revista Iberoamericana de Micologia. 31(1):49–53.

Eiken Chemical Co. Ltd. 2019. A Guide to LAMP primer designing (Manual). Tokyo, Japón. https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html

Espinel-Ingroff A.V. 2003. Medical Mycology in the United States: A Historical Analysis (1894–1996). Springer, Dordrecht. Dordrecht, Netherlands. 221 pp.

Fisher M.C., Koenig G., White T.J. y Taylor J.W. 2000. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Molecular Biology and Evolution. 17(8):1164–1174.

Foo, P.C., Najian, A.B.N., Muhamad, N.A., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean, C.Y. y Lim, B.H. 2020. Loop-mediated isothermal amplification ( LAMP ) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications : a comparative analysis study of LAMP , conventional PCR , nested PCR ( nPCR ) and real-time PCR ( qPCR ) based on Entamoeba histolytica DNA derived from faecal sample. BMC Biotechnology- 20(1). 34.

Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., Perkins M.D. y Schrenzel J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 62(1):41–48.

Gago S., Buitrago M.J., Clemons K.V., Cuenca-Estrella M., Mirels L.F. y Stevens D.A. 2014. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay for the early diagnosis of

coccidioidomycosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 79(2):214–221.

Galgiani J.N., Ampel N.M., Blair J.E., Catanzaro A., Geertsma F., Hoover S.E., Johnson R.H., Kusne S., Lisse J., MacDonald J.D., Meyerson S.L., Raksin P.B., Siever J., Stevens D.A., Sunenshine R. y Theodore N. 2016. 2016 Infectious Diseases Society of America (IDSA) Clinical Practice Guideline for the Treatment of Coccidioidomycosis. Clinical Infectious Diseases. 63(6):e112–e146.

Galgiani J.N., Hayden R. y Payne C.M. 1982. Leukocyte effects on the dimorphism of *Coccidioides immitis*. Journal of Infectious Diseases. 146(1):56–63.

Garcia-Garcia S.C., Gomez-Flores M., Vera-Cabrera L., Salas-Alanis J.C., Gonzalez-Gonzalez, S.E. y Ocampo-Candiani J. 2015. Coccidioidomycosis and the skin: a comprehensive review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 60(5):610–619.

Gastélum-Cano, J. M., Dautt-Castro, M., García-Galaz, A., Felix-Murray, K., Rascón-Careaga, A., Cano-Rangel, M.A., y Islas-Osuna, M.A. 2021. The clinical laboratory evolution in coccidioidomycosis detection: future perspectives. Journal de Mycologie Medicale. 31(3):101159.

Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A. y Hanaki K.I. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. BioTechniques. 46(3):167–172.

Green M. y Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volumen 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cuarta edición. New York. 1885 pp.

Groelz D., Viertler C., Pabst D., Dettmann N. y Zatloukal, K. 2018. Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. PLoS ONE. 13(9):1–16.

Hamm P.S., Hutchison M.I., Leonard P., Melman S. y Natvig D.O. 2019. First analysis of human *Coccidioides* isolates from new Mexico and the southwest four corners region: Implications for the distributions of C. *posadasii* and C. *immitis* and human groups at risk. Journal of Fungi. 5(3):74.

Hattori T., Chagan-Yasutan H., Shiratori B., Egawa S., Izumi T., Kubo T., Nakajima C., Suzuki Y., Niki T., Alisjahbana B. y Telan, E. 2016. Development of point-of-care testing for disaster-related infectious diseases. Tohoku Journal of Experimental Medicine. 238(4):287–293.

Hayden R.T., Qian X., Roberts G.D. y Lloyd R.V. 2001. In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. Diagnostic Molecular Pathology. 10(1):15–23.

Hemashettar B.M. y Padhye A.A. 2011. Coccidioidomycosis in India: Report of a third imported case. Journal de Mycologie Medicale. 21(1):33–36.

Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., y Loening, S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Research. *25*(19):3957–3958.

Hernandez H., Erives V.H. y Martinez L.R. 2019. Coccidioidomycosis: Epidemiology, Fungal Pathogenesis, and Therapeutic Development. Current Tropical Medicine Reports. 6:132–144.

Hung C.Y., Seshan K.R., Yu J.J., Schaller R., Xue J., Basrur V., Gardner M.J. y Cole G.T. 2005. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection.

Infection and Immunity. 73(10):6689–6703.

Hung C.Y., Xue J. y Cole G.T. 2007. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:225–235.

Iwen P.C., Hinrichs S.H. y Rupp M.E. 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Medical Mycology. 40(1):87–109.

James A.E., Pastenkos G., Bradway D. y Baszler T. 2019. Autochthonous Transmission of *Coccidioides* in Animals, Washington, USA. Emerging Infectious Diseases. 25(1):123–125.

Johnson R., Ho J., Fowler P. y Heidari A. 2018. Coccidioidal Meningitis: A Review on Diagnosis, Treatment, and Management of Complications. Current Neurology and Neuroscience Reports. 18(4):19.

Johnson S.M., Carlson E.L. y Pappagianis D. 2014. Determination of Ribosomal DNA Copy Number and Comparison Among Strains of *Coccidioides*. Mycopathologia. 179(1):45–51.

Kaneko H., Kawana T., Fukushima E. y Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 70(3):499–501.

Kaufman L. 1992. Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. Clinical Infectious Diseases. 14:S23–S29.

Kirkland T.N. y Fierer J. 2018. *Coccidioides immitis* and *posadasii*: a review of their biology, genomics, pathogenesis, and host immunity. Virulence. 9(1):1426–1435.

Kirkland T.N. y Muszewska A. 2018. Analysis of Transposable Elements in *Coccidioides* Species. Journal of Fungi. 4(1):13.

Kuboki N., Inoue N., Sakurai T., Di Cello F., Grab D.J., Suzuki H., Sugimoto C. y Igarashi I. 2003. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of African Trypanosomes. Journal of Clinical Microbiology. 41(12):5517–5524.

Laniado-Laborin R. 2007. Expanding understanding of epidemiology of coccidioidomycosis in the western hemisphere. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:19–34.

Laniado-Laborín R., Arathoon E.G., Canteros C., Muñiz-Salazar R. y Rendon A. 2019. Coccidioidomycosis in Latin America. Medical Mycology. 57 (Supplement 1):S46–S55.

Lapierre S.G. y Drancourt M. 2018. rpoB targeted loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for consensus detection of mycobacteria associated with pulmonary infections. Frontiers in Medicine. 5:332.

Malo J., Luraschi-Monjagatta C., Wolk D.M., Thompson R., Hage C.A. y Knox K.S. 2014. Update on the diagnosis of pulmonary coccidioidomycosis. Annals of the American Thoracic Society. 11(2):243–253.

Meagher, R.J., Priye A., Light Y.K., Huang C. y Wang E. 2018. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. Analyst. 143(8):1924–1933.

Mertz L.E. y Blair J.E. 2007. Coccidioidomycosis in rheumatology patients: Incidence and potential risk factors. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111, 343–357.

Mitchell M., Dizon D., Libke R., Peterson M., Slater D. y Dhillon A. 2015b. Development of a real-time PCR assay for identification of Coccidioides immitis by use of the BD Max system. Journal of Clinical Microbiology. 53(3):926–929.

Molina-Morant D., Sánchez-Montalvá A., Sao-Avilés A., Salvador F. y Molina I. 2018. Imported endemic mycoses in Spain : Evolution of hospitalized cases, clinical characteristics and correlation with migratory movements, 1997-2014. PLoS Neglected Tropical Diseases. 12(2):e0006245.

Mori Y., Nagamine K., Tomita N. y Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochemical and Biophysical Research Communications. 289(1):150–154.

Musher D.M. y Thorner, A. R. 2014. Community-Acquired Pneumonia. New England Journal of Medicine. 371(17):1619–1628.

Nagamine K., Hase T. y Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes. 16(3):223–229.

Neafsey D.E., Barker B.M., Sharpton T.J., Stajich J.E., Park D.J., Whiston E., Hung C., Mcmahan C., White J., Sykes S., Heiman D., Young S., Zeng Q., Abouelleil A., Aftuck L., Bessette D., Brown A., Fitzgerald M., Lui A., Macdonald J.P., Priest M., Orbach, M.J., Galgiani J.N., Kirkland T.N., Cole G.T., Birren B.W., Henn M.R., Taylor J.W. y Rounsley S.D. 2010. Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. Genome Research. 20(7):938–946.

New England Biolabs Inc. (2021). *FAQ: Can Bst 2.0 DNA Polymerase be used at temperatures other than 65°C?* https://international.neb.com/faqs/2012/08/28/can-bst-2-0-dna-polymerase-be-used-at-temperatures-other-than-65-c

Nguyen C., Barker B.M., Hoover S., Nix D.E., Ampel N.M., Frelinger J.A., Orbach M.J. y Galgiani J.N. 2013. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of Coccidioidomycosis. Clinical Microbiology Reviews. 26(3):505–525.

Noden, B.H., Martin, J., Carrillo, Y., Talley, J.L. y Ochoa-, F. M. 2018. Development of a loop-mediated isothermal amplification ( LAMP ) assay for rapid screening of ticks and fleas for spotted fever group rickettsia. PLoS One. 13(2):e0192331.

Nosanchuk J.D. y Casadevall A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cellular Microbiology. 5(4):203–223.

Nosanchuk J.D., Yu J.J., Hung C.Y., Casadevall A. y Cole G.T. 2007. *Coccidioides posadasii* produces melanin in vitro and during infection. Fungal Genetics and Biology. 44(6):517–520.

Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. y Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12):e63.

Pan S. y Cole G.T. 1995. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. Infection and Immunity. 63(10):3994–4002.

Posadas A. 1928. Obras completas. Buenos Aires: Imprenta de la Universidad. Primera edición. Buenos Aires, Argentina. 544 pp.

Pryce T.M., Palladino S., Kay I.D. y Coombs G.W. 2003. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. Medical Mycology. 41(5):369–381.

Ranjbar, R. y Afshar, D. 2015. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Yersinia enterocolitica via targeting a conserved locus. Iranian journal of Microbiology. 7(4):185–190.

Reyes-Montes M.R., Frías-De-León M.G., Victoriano-Pastelín I., Acosta-Altamirano G. y Duarte-Escalante E. 2019. Design and evaluation of an AFLP molecular marker for the detection of *Coccidioides* spp. in biological samples. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 23(5):322–330.

Reyes-Montes M.R., Pérez-Huitrón M.A., Ocaña-Monroy J.L., Frías-De-León M.G., Martínez-Herrera E., Arenas R. y Duarte-Escalante E. 2016. The habitat of *Coccidioides* spp. and the role of animals as reservoirs and disseminators in nature. BMC Infectious Diseases. 16(1):1–8.

Roilides E., Sigler L., Bibashi E., Katsifa H., Flaris N. y Panteliadis C. 1999. Disseminated infection due to Chrysosporium zonatum in a patient with chronic granulomatous disease and review of non-aspergillus fungal infections in patients with this disease. Journal of Clinical Microbiology. 37(1):18–25.

Rosenstein N.E., Emery K.W., Werner S.B., Kao A., Johnson R., Rogers D., Vugia D., Reingold A., Talbot R., Plikaytis B.D., Perkins B.A. y Hajjeh R.A. 2001. Risk Factors for Severe Pulmonary and Disseminated Coccidioidomycosis: Kern County, California, 1995-1996. Clinical Infectious Diseases. 32(5):708–714.

Santelli A.C., Blair J.E. y Roust L.R. 2006. Coccidioidomycosis in Patients with Diabetes Mellitus. American Journal of Medicine. 119(11):964–969.

Saubolle M.A. 2007. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:301–314.

Saubolle M.A., McKellar P.P. y Sussland D. 2007. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. Journal of Clinical Microbiology. 45(1):26–30.

Saubolle M.A., Wojack, B.R., Wertheimer, A.M., Fuayagem A.Z., Young S. y Koeneman B.A. (2018). Multicenter Clinical Validation of a Cartridge-Based Real-Time PCR System for Detection of *Coccidioides* spp. in Lower Respiratory Specimens. Clin Microbiol. 56(2):e01277-17.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. y Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109(16):6241–6246.

Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., Gardner M.J., Wortman J.R., Jordar V.S., Maiti R., Kodira C.D., Neafsey D.E., Zeng Q., Hung C.Y., McMahan C., Muszewska A., Grynberg M., Mandel M.A., Kellner E.M., Barker B.M., Galgiani J.N., Orbach M.J., Kirkland, T.N., Cole G.T., Henn M.R., Birren B.W. y Taylor J.W. 2009. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. Genome Research. 19(10):1722–1731.

Shete P.B., Farr K., Strnad L., Gray C.M. y Cattamanchi A. 2019. Diagnostic accuracy of TB-LAMP for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases. 19(1):268.

Shirato, K. 2019. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. Microbiology and Immunology. *63*(10):407–412.

Siddiqui A.S. Y Zimmerman J.L. 2016. Pulmonary Infection Secondary to Chrysosporium zonatum in an Immunocompetent Man. Annals of the American Thoracic Society. 13(5). 757–758.

Smith C. y Beard R. 1946. Effect of Seaseon and Dust Control on Coccidioidomycosis. Journal of the American Medical Association. 132(14):833–838.

Stockman L., Clark K.A., Hunt J.M. y Roberts G.D. 1993. Evaluation of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, and *Histoplasma capsulatum*. Journal of Clinical Microbiology. 31(4):845–850.

Suankratay C., Dhissayakamol O., Uaprasert N. y Chindamporn A. 2015. Invasive pulmonary infection caused by *Chrysosporium articulatum*: The first case report. Mycoses. 58(1):1–3.

Suchonwanit P., Chaiyabutr C. y Vachiramon V. 2015. Primary cutaneous *chrysosporium* infection following ear piercing: A case report. Case Reports in Dermatology. *7*:136–140.

Sunenshine R.H., Anderson S., Erhart L., Vossbrink A., Kelly P.C., Engelthaler D. y Komatsu K. 2007. Public health surveillance for coccidioidomycosis in Arizona. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:96–102.

Taroumian S., Knowles S.L., Lisse J.R., Yanes J., Ampel N.M., Vaz A., Galgiani J.N. y Hoover S.E. 2012. Management of coccidioidomycosis in patients receiving biologic response modifiers or disease-modifying antirheumatic drugs. Arthritis Care and Research. 64(12):1903–1909.

Taylor J.W. y Barker B.M. 2019. The endozoan, small-mammal reservoir hypothesis and the life cycle of *Coccidioides* species. Medical Mycology. 57:S16–S20.

Teixeira M.D.M., Barker M. y Stajich J.E. 2019. Improved Reference Genome Sequence of *Coccidioides immitis* Strain WA_211, Isolated in Washington State. Microbiology Resource Announcements. 8(33):e00149-19.

Thermo Scientific. 2015. CloneJET PCR Cloning Kit #K1231, #K1232. Protocols and Product Manuals.

Tintelnot K., De Hoog G.S., Antweiler E., Losert H., Seibold M., Brandt M.A., van den Ende A.H.G.G. y Fisher M.C. 2007. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidiodes immitis* and *Coccidiodes posadasii*. Medical Mycology. 45(5):385–393.

Vucicevic D., Blair J.E., Binnicker M.J., McCullough A.E., Kusne S., Vikram H.R., Parish J.M. y Wengenack N.L. 2010. The utility of *Coccidioides* polymerase chain reaction testing in the clinical setting. Mycopathologia. 170(5):345–351.

Wack E.E., Ampel N.M., Sunenshine R.H. y Galgiani J.N. 2015. The return of delayed-type hypersensitivity skin testing for coccidioidomycosis. Clinical Infectious Diseases. 61(5):787–791.

Whiston E. y Taylor J.W. 2014. Genomics in *Coccidioides*: Insights into evolution, ecology, and pathogenesis. Medical Mycology. 52(2). 149–155.

Whiston E. y Taylor J.W. 2016. Comparative Phylogenomics of Pathogenic and Nonpathogenic Species. G3. 6(2):235–244.

Wise H.Z., Hung C.Y., Whiston E., Taylor J.W. y Cole G.T. 2013. Extracellular ammonia at sites of pulmonary infection with *Coccidioides posadasii* contributes to severity of the respiratory disease. Microbial Pathogenesis. 59–60:19–28.

Woźniakowski, G., Kozdruń, W., y Samorek-Salamonowicz, E. 2012. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. Viriology Journal, 9:110.

Xue J., Chen X., Selby D., Hung C.Y., Yu J.J. y Cole G.T. 2009. A genetically engineered live attenuated vaccine of *Coccidioides posadasii* protects BALB/c mice against coccidioidomycosis. Infection and Immunity. 77(8):3196–3208.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. *13*:134.

Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q., y Wu, L. 2014. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. Scientific reports. 4:4912.