

IDENTIDAD GENETICA DEL HONGO CAUSANTE DEL PRIMER CASO DE COCCIDIOIDOMICOSIS
DESCRITO POR ALEJANDRO POSADAS EN 1892

CRISTINA E. CANTEROS¹, ADRIANA TORANZO¹, ROBERTO SUAREZ-ALVAREZ^{1,2}, GRACIELA DAVEL¹,
LAURA R. CASTAÑÓN-OLIVARES², JOSE NAPOLI³.

¹Departamento Micología. INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires; ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF; ³Museo de Patología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen En 1892, Alejandro Posadas documentó el primer caso mundial de coccidioidomicosis en un paciente argentino de nombre Domingo Escurra. Con el objetivo de identificar la especie de *Coccidioides* involucrado en ese caso, analizamos una pieza de necropsia del paciente, conservada en el Museo de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. La porción del tejido con mayor número de endosporas del hongo libres e integras fue elegida utilizando una coloración inmunohistoquímica específica. El ADN fúngico fue amplificado usando una PCR anidada que reconoce un fragmento del gen *Ag2/PRA* cuyo polimorfismo diferencia *Coccidioides immitis* y *C. posadasii*. Se amplificó además, el ADN de dos cepas de referencia: *C. immitis* (M38-05) y *C. posadasii* (1-NL) y de cuatro aislamientos de *Coccidioides* de pacientes argentinos. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados en ambas hebras. Las secuencias fueron editadas, alineadas y comparadas con las depositadas en GenBank *C. posadasii* (Acceso N° AY536446, cepa Silveira) y *C. immitis* (Acceso N° AY536445). Las secuencias del *Coccidioides* del caso Escurra, de los aislamientos argentinos y de la cepa 1-NL fueron idénticos entre sí y mostraron una mutación puntual de C→G en la posición 1228 en comparación con la secuencia de *C. posadasii*, cepa Silveira. Este es el primer trabajo donde se busca ADN de *Coccidioides* en una pieza anatómica de museo con más de 100 años de antigüedad. Los resultados confirman que el primer caso de coccidioidomicosis o enfermedad de Posadas documentado mundialmente fue producido por el recientemente descrito *C. posadasii*.

Palabras clave: coccidioidomicosis, *Coccidioides posadasii*, Alejandro Posadas, secuencia de ADN

Abstract *Genetic characterization of the fungus involved in the first case of coccidioidomycosis described by Alejandro Posadas in 1892.* In 1892 Alejandro Posadas described the first worldwide case of coccidioidomycosis in a patient named Domingo Escurra. A preserved necropsy piece from the patient's remains is conserved in the Museum of Pathology of the Medical School, Buenos Aires University. Paraffin-embedded specimens obtained from this piece served to identify the fungus involved in the case. Histological slices from different lesion sites were submitted to a genus-specific immunohistochemical staining in order to select the more suited areas in terms of abundance/integrity of fungal sporangia and endospores. Fungal DNA was amplified from selected deparaffinated slices using a nested PCR designed to amplify a segment of the gen *Ag2/PRA* and differentiate *C. immitis* from *C. posadasii*. This PCR was also applied to two reference strains (*C. immitis* M38-05, *C. posadasii* 1-NL) and isolates obtained from four recent coccidioidomycosis cases occurred in Argentina. Amplified products were submitted to sequencing of both DNA strands. The obtained sequences were edited, aligned and compared with *C. posadasii* (Access N° AY536446, strain Silveira) and *C. immitis* (Access N° AY536445) deposited in GenBank. DNA sequences from Escurra's lesions were 100% homologous to the recent Argentinean cases and the reference strain 1-NL. A single point C→G difference in position 1228 was observed with respect to sequence of strain *C. posadasii* Silveira. For the first time, *Coccidioides* DNA is recovered from a museum piece which is more than 100-year-old. Our results confirm that the original case of Posadas's disease was caused by the recently described *C. posadasii*.

Key words: coccidioidomycosis, *Coccidioides posadasii*, Alejandro Posadas, DNA sequence



Fig. 1.– Piezas anatómicas del paciente Escurra conservadas en el Museo de Patología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Pieza N° 779.

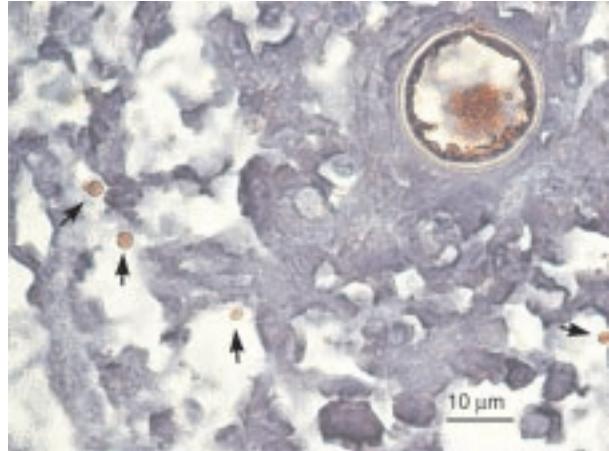


Fig. 3.– Corte histológico del pie izquierdo del paciente Escurra. Se observan endosporas dentro de una esférula. Las flechas indican endosporas libres. IHQ; 400X.

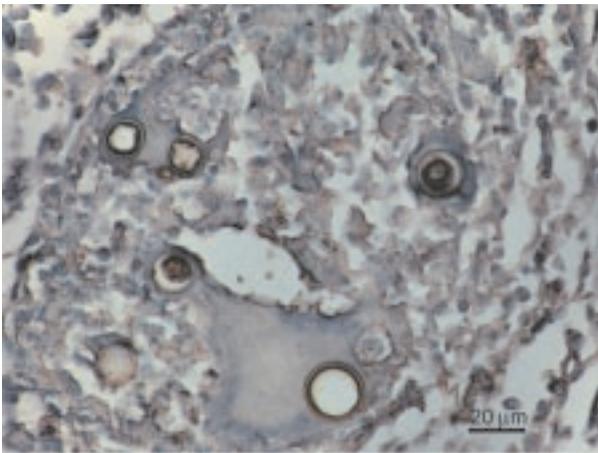


Fig. 2.– Corte histológico del pie izquierdo del paciente Escurra. Se observan varias esférulas de diferentes tamaños con endosporas. IHQ; 200X.

La coccidioidomicosis es una micosis profunda endémica en toda América. La enfermedad es de comienzo respiratorio agudo, generalmente benigna y cura espontáneamente¹; sin embargo, puede evolucionar hacia formas progresivas que diseminan a los tejidos cutáneo, subcutáneo, visceral y óseo. Las formas graves y con alta morbimortalidad están asociadas a pacientes inmunocomprometidos².

El hospedero susceptible adquiere la infección cuando inhala los artoconidios dispersos en la naturaleza. Una vez en los tejidos del hospedero, el hongo se transforma a la fase parasitaria representada por esférulas de 30 a 60 µm con endosporas uninucleadas de 2 a 5 µm. Estos elementos, son los que permiten el diagnóstico de

la enfermedad mediante examen directo de los materiales clínicos³.

Recientemente se determinó que *C. immitis*, especie considerada como la única causante de coccidioidomicosis, en realidad estaba constituida por dos especies, la ya conocida *immitis* y la recientemente clasificada *posadasii*⁴. Aun cuando se han observado diferencias fisiológicas y de virulencia entre ambas especies, por el momento son sólo distinguibles genéticamente^{5, 6}.

El primer caso mundial de coccidioidomicosis fue documentado en un soldado de caballería nacido en San Luis, República Argentina. El paciente de 36 años, de nombre Domingo Escurra, presentaba lesiones cutáneas tumorales recurrentes de tres años de evolución. En el año 1891 ingresó al Hospital de la Universidad de Buenos Aires con lesiones tumorales en cara, tórax, abdomen, muslo izquierdo y brazos. El entonces estudiante de medicina Alejandro Posadas tomó material por raspado y extirpación de las lesiones para estudiarlas. En colaboración con su maestro el Dr. Wernicke y utilizando técnicas histológicas determinó que el causante era un parásito al que denominó Esporozoario o Psorospermia haciendo una descripción minuciosa y completa del cuadro clínico del paciente y del microorganismo^{7, 8}. Estudiante y maestro continuaron investigando el parásito y en el año 1894, al ver que éste cumplía con los postulados de Koch lo identificaron como un protozoario del orden Coccidia⁹.

En 1898 fallece el paciente Escurra y Posadas efectúa la autopsia tomando muestras de las múltiples lesiones, realizando estudios anatómo-patológicos, fotodocumentando coloraciones histológicas y las lesiones producidas por la enfermedad⁹. Actualmente, las fotografías originales de las imágenes histopatológicas y de las le-

siones en piel del paciente, así como las piezas anatómicas de la necropsia de mano y pie se conservan en el Museo de Patología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la UBA con el N° de frasco 779.

A partir de dos casos similares descritos en EE.UU., el microorganismo es denominado *C. immitis* y *C. pyogenes* aún creyendo que se trataba de un protozooario¹⁰. Es finalmente en 1905, donde los estudios taxonómicos y de filogenia, re-clasificaron e identificaron al microorganismo como un hongo ascomiceto al que denominaron *Coccidioides immitis*^{11,12}.

En 1994, con el inicio de la caracterización de aislamientos utilizando técnicas moleculares como el RFLP, se demostró la existencia de grupos genéticamente diferenciables entre aislamientos de distintas regiones geográficas¹³. Estos hallazgos fueron posteriormente confirmados por diferentes autores, demostrando la existencia de un taxon *California* (CA) y otro *no-California* (no-CA) que perdieron la capacidad de entrecruzarse¹⁴⁻¹⁶. Estudios realizados por Peng et al.¹⁶ demostraron que el gen que codifica para el antígeno rico en prolina, conocido como PRA o Ag2/PRA (gen *Ag2/PRA*), diferenciaba cepas CA (*C. immitis*) de no-CA (*C. posadasii*). Sobre un fragmento de este gen Bialek et al.¹⁷ diseñaron una PCR anidada aplicable sobre tejidos.

Recientemente, otros autores confirmaron la existencia de diferentes especies utilizando distintos métodos moleculares. Umeyama et al.¹⁸ describieron dos oligonucleótidos que distinguen las especies por el tamaño de los amplicones, 720 pb para *C. immitis* y 634 pb para *C. posadasii*. Por su parte, Castañón-Olivares et al.¹⁹ identificaron a cada una de las especies utilizando sondas Taqman para amplificar los polimorfismos sencillos de nucleótidos (SNP) en tres secuencias blanco: prolina 157, prolina 174 y glucosa sintetasa 192.

Teniendo en cuenta la importancia histórica del primer caso descrito de coccidioidomicosis, fue nuestro objetivo conocer la especie de *Coccidioides* involucrada en el caso Escurra analizando el ADN fúngico de las piezas anatómicas del paciente.

Materiales y métodos

Se utilizaron las cepas de referencia: *C. posadasii* 1-NL (acrónimo cepa 1)¹⁹ y *C. immitis* M38-05 (acrónimo 5273)⁴, ambas utilizadas en estudios previos y depositadas en la colección de cultivos fúngicos de la Facultad de Medicina de la UNAM, México. Se incluyeron, además, cuatro aislamientos de *Coccidioides* sp. (073089, 073094, 073129 y 073130) provenientes de cuatro pacientes argentinos diagnosticados con coccidioidomicosis entre noviembre del 2006 y septiembre del 2007; conservados en la colección de cultivos fúngicos del Departamento Micología del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán.

Todos los aislamientos fueron trabajados en estrictas condiciones de bioseguridad según recomendaciones del centro

de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU.²⁰. Se mantuvieron en agar Mycosel (*BBL*, Detroit, MI) y fueron confirmados como *Coccidioides* sp. por sus características morfológicas, reversión de micelio a esférula en el medio de Converse y la evidencia de exoantígenos específicos utilizando la técnica de inmunodifusión³.

Se estudiaron muestras de tejido provenientes de las lesiones granulomatosas presentes en la zona dorsal del pie izquierdo de las piezas de necropsias del paciente Escurra (Fig. 1). Las muestras de tejido fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes de 3 a 5 µm de espesor, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina, ácido peryódico de Schiff y plata-metenamina Gomori-Grocott. En aquellos cortes en donde se identificaron esférulas con endosporas se realizó una coloración inmunohistoquímica (IHQ) específica para detectar la presencia, la integridad y cantidad de endosporas libres en el tejido y en el interior de las esférulas.

La técnica de inmunohistoquímica utilizada fue la descrita por Shi et al.²¹ con modificaciones. Los cortes colocados sobre portaobjetos cargados positivamente (*Superfrost Plus*, *Shandon Inc.* Pittsburgh, PA) fueron desparafinados de manera secuencial: en estufa a 60 °C, xilol, etanol absoluto, etanol 96°, etanol 70°, etanol 50° y agua destilada. Luego se bloqueó la peroxidasa endógena adicionando 10% de peróxido de hidrógeno en metanol (vol/vol), durante 30 min a 24-27 °C. Se lavó tres veces por 5 min con amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.2. Se bloquearon los sitios no reactivos con Tris-HCl adicionado con 0.1% de Triton X 100 y 1% de albúmina sérica bovina durante 1 h a 24-27 °C. Las preparaciones fueron lavadas con Tris-HCl y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con un suero hiperinmune anti-*Coccidioides* sp. preparado en conejo según protocolo previamente descrito²². Al día siguiente, se lavaron los cortes tres veces por 5 min y se incubaron durante 1 h a 24 - 27 °C, con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo hecho en cabra (*Gibco Laboratories*, Grand Island, NY), diluido 1:100 en Tris-HCl. Luego de un lavado con Tris-HCl, las preparaciones se incubaron con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (*Sigma-Aldrich Co*, St Louis, MO) diluido 1:100 en Tris-HCl durante 30 min a 24 - 27 °C. Todas las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda. Luego de un lavado con amortiguador Tris-HCl se incubaron 2-3 min con solución de aminoetilcarbazol (*AEC-Histostain*, *Zymed Laboratories*, CA) hasta producir coloración rojiza. Finalmente, las preparaciones se lavaron en agua corriente y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer durante 30 s y fueron montadas con resina hidrosoluble.

La extracción de ácidos nucleicos de las cepas y aislamientos fúngicos se efectuó a partir de esférulas del hongo producidas *in vitro*. Partiendo de un cultivo de 15 días en agar extracto de levadura-glucosa el micelio fue subcultivado en agar purificado (agar 1% en agua), incubando en obscuridad a 25-27 °C hasta la formación de abundantes artroconidios. Los artroconidios fueron inoculados en el medio de Converse e incubados a 37 °C en atmósfera de 10% de CO₂, controlándose semanalmente hasta que se observó presencia de esférulas³. Los cultivos fueron inactivados con mertiolato al 1% durante 24 h, luego las esférulas se lavaron con solución salina (cloruro de sodio 0.15M) y se concentraron por centrifugación. Las esférulas fueron pretratadas con 200U de liticase por 90 min a 25 °C y luego incubadas con el amortiguador de lisis del equipo *DNeasy tissue kit* (*Qiagen*, Hilden, Alemania), adicionado con proteinasa K durante toda la noche a 37 °C. El ADN extraído y purificado fue conservado en amortiguador TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.0) a -20 °C hasta su uso.

El ADN fúngico contenido en las muestras de tejido del pie de Escurra fue extraído y purificado utilizando *DNeasy*

tissue kit (Qiagen). Brevemente, el tejido fue desparafinado con xilol y dos lavados de etanol absoluto. Para eliminar los residuos de alcohol se centrifugó 10 min a 10000 rpm y el *pellet* se dejó secar a 37 °C durante 15 min. El material se incubó a 55 °C durante toda la noche con 180 ml de amortiguador de lisis y 20 ml de proteinasa K provistas por el equipo. Para facilitar la ruptura de los esporangios y endosporas, las muestras fueron sometidas a choque térmico alternando tres veces nitrógeno líquido y agua hirviendo. Luego de una fuerte agitación con vórtex se continuó la técnica según las especificaciones del fabricante. El ADN fue conservado en amortiguador TE a -20 °C hasta su uso.

Se utilizaron dos técnicas de PCR para amplificar el ADN fúngico de los aislamientos y de la muestra de Ecurra. La PCR descrita por Bialek et al.¹⁷ amplifica en la secuencia anidada un fragmento de ADN del gen *Ag 2/PRA* localizado entre la posición 962 y 1303 de la cepa Silveira (*GenBank* Acceso N° AF013256 prototipo de *C. posadasii*). Esta secuencia, con una porción común con la analizada previamente por Peng et al.¹⁶ muestra el fragmento que puede diferenciar entre *C. immitis* y *C. posadasii*. Por su parte los *primers* diseñados por Umeyama et al.¹⁸ delimitan una porción de 720 pb para *C. immitis* y una de 634 pb para *C. posadasii*.

Los productos amplificados de la PCR anidada obtenidos de los cortes histológicos de las lesiones del pie de Ecurra, de los cuatro aislamientos de pacientes argentinos y de las dos cepas de referencia *C. immitis* (M38-05) y *C. posadasii* (1N-L) fueron purificados y derivados al Servicio de Secuenciación y Genotipado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, para su secuenciación automatizada. Cada una de las secuencias fue verificada en dos experiencias independientes.

Las secuencias de los segmentos de ADN amplificados a partir de los cortes histológicos del pie de Ecurra, de las cepas de referencia *C. immitis* M38-05 y *C. posadasii* 1-NL y de los aislamientos de pacientes argentinos fueron editadas en *BioEdit* (ver 7.0.9.0.)²³. Las secuencias fueron comparadas con la secuencia completa del gen *Ag2/PRA* depositada en el *GenBank*, Acceso N° AF013256, y de dos secuencias parciales del mismo gen: *C. immitis* (*GenBank* Acceso N° AY536445) y *C. posadasii* (*GenBank* Acceso N° AY536446).

Resultados

Una foto reciente de las piezas anatómicas conservadas en el Museo permite observar claramente las lesiones descritas por Posadas en el pie y la mano del paciente (Fig. 1). Con todas las coloraciones de rutina se observaron diferentes cantidades de esférulas en los distintos trozos de tejido tomados de la lesión del dorso del pie. Estas coloraciones permitieron elegir, entre las distintas muestras de tejido, la que poseía mayor cantidad de elementos fúngicos.

La inmunohistoquímica, realizada sobre el corte de tejido con alta concentración de esférulas, permitió detectar fácilmente la gran cantidad de endosporas íntegras en el interior de las esférulas (Fig. 2) y libres en el tejido (Fig. 3). Esta tinción nos permitió elegir las muestras a partir de las que se realizó la extracción de ADN fúngico para su amplificación por PCR.

La PCR anidada amplificó un fragmento de aproximadamente 340 pb, a partir del ADN de todas las muestras

analizadas. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia completa del gen *Ag2/PRA* (AF013256, Cepa Silveira) entre la posición 967 y 1280. Las secuencias del ADN de *Coccidioides* del caso Ecurra, al igual que las de los aislamientos clínicos de pacientes argentinos y la de la cepa de referencia 1-NL, presentaron un fragmento de 12 bases entre las posiciones 996 a 1007 presente en *C. posadasii* y ausente en *C. immitis* (Fig. 4). Otras diferencias que identificaron a cada una de las especies fueron delecciones puntuales de A en las posiciones 1262 y 1275 para *C. posadasii*. La secuencia analizada de la cepa de referencia de *C. immitis* M38-05 fue idéntica a la secuencia del gen *Ag2/PRA* de *C. immitis* (*GenBank* AY536445). La única diferencia observada entre la secuencia de la cepa Silveira (AY536446) y la de los *C. posadasii* de pacientes argentinos, de la cepa 1-NL y del caso Ecurra es una mutación puntual de C→G, en la posición 1228 (Fig. 4).

La PCR de Umeyama et al.¹⁸ realizada sobre los ADN de aislamientos de pacientes y la cepa de referencia *C. posadasii* 1-NL mostraron una banda de 634 pb, y la cepa *C. immitis* M38-05 una de 720 pb. Esta PCR no amplificó el ADN de *Coccidioides* del caso Ecurra.

Discusión

Pocos estudios utilizando técnicas de biología molecular se han realizado sobre agentes fúngicos en piezas de museos y este es el primer trabajo donde se busca ADN de *Coccidioides* en una pieza con más de 100 años de antigüedad. El estado de conservación de las piezas anatómicas de Ecurra es excelente, claramente se pueden observar las lesiones en la zona dorsal del pie y la mano, además de la coloración de la piel (Fig. 1). Es probable que las substancias altamente higroscópicas (acetato de potasio y glicerina) utilizadas en la época de Posadas para la conservación de tejidos²⁴ permitieron que las piezas conserven su volumen y tengan una constitución firme, características que nos permitieron el análisis de los tejidos.

Los antecedentes que conocemos acerca de lo observado en el primer caso de coccidioidomicosis, son las descripciones, los dibujos y fotografías que Posadas documentó, concluyendo que estaba en presencia de un protozoario⁹. Agregamos a los estudios de Posadas una técnica inmunohistoquímica y un método molecular sensible y específico para determinar la etiología fúngica del agente infeccioso involucrado en el caso.

La técnica inmunohistoquímica empleada permitió identificar certera y claramente las estructuras parasitarias del hongo, reconociendo la buena calidad y cantidad de endosporas dentro de las esférulas y libres en los tejidos, facilitándonos la elección de las mejores muestras de tejido para la extracción de ADN.

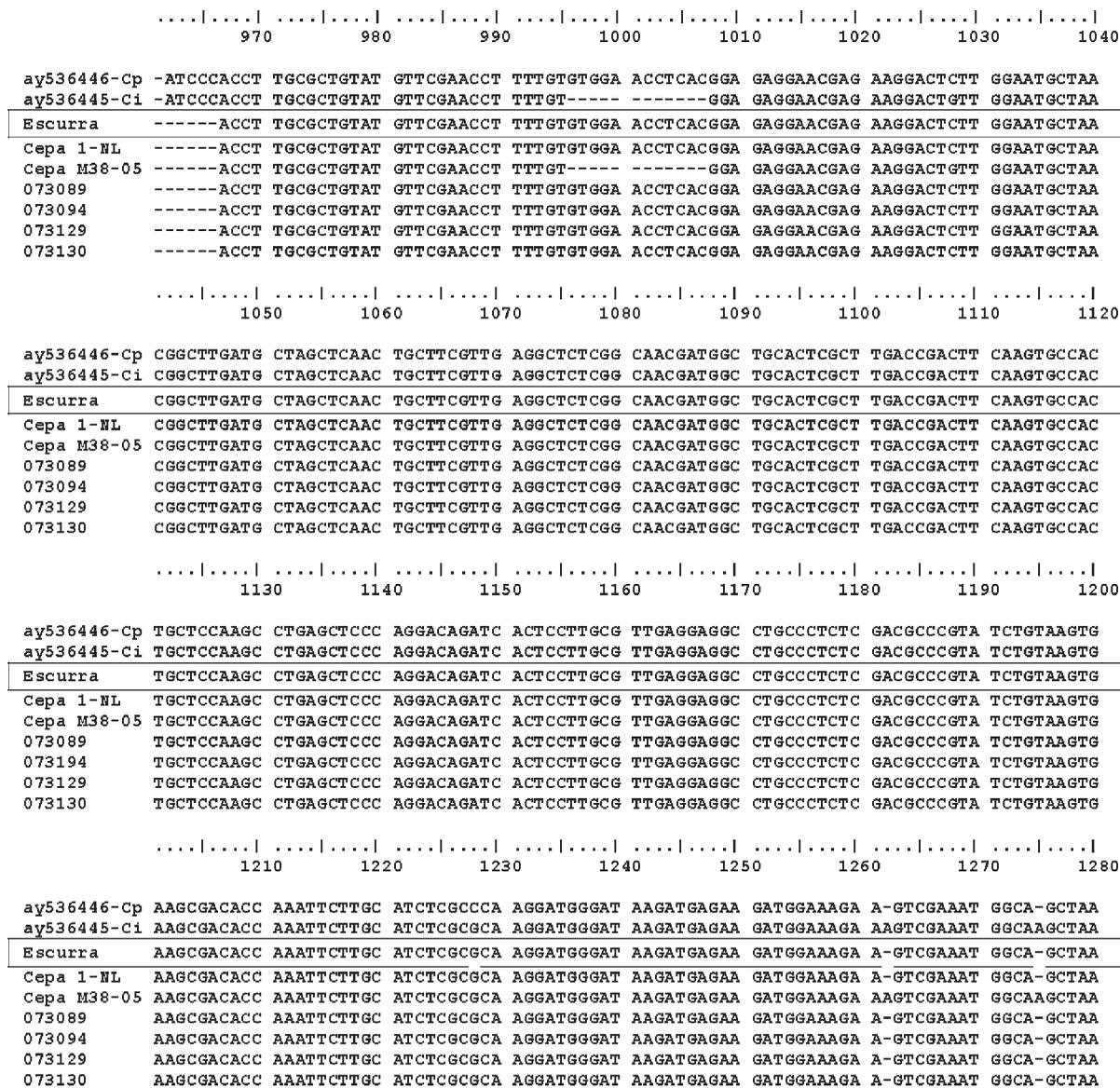


Fig. 4.– Alineamiento de los fragmentos secuenciados. Las posiciones nucleotídicas indican la posición respecto al gen *Ag2/PRA* completo (*GenBank* Acceso N° AF013256). Las primeras dos secuencias corresponden a las depositadas en el *GenBank*: *C. posadasii* (Cp) Acceso N° AY536445 y *C. immitis* (Ci) Acceso N° AY536445. A continuación aparecen: la secuencia del caso Eскурra, la de las cepas de referencia 1-NL y M38-05 y la de los aislamientos de los pacientes argentinos (073089, 073094, 073129 y 073130). Sobre la secuencia del caso Eскурra se encuentran sombreadas las bases que confirman su identidad como *C. posadasii*.

Los cuatro aislamientos de pacientes argentinos y el ADN obtenido de las piezas de Eскурra fueron identificados como *C. posadasii* analizando la secuencia del gen *Ag2/PRA*. Este hecho no nos sorprendió, ya que cepas de otros nueve pacientes argentinos, distintas de las utilizadas en este trabajo, ya habían sido clasificadas como pertenecientes a esta nueva especie utilizando diferentes métodos⁴. En coincidencia con el trabajo de Fisher et

al.⁴, los aislamientos argentinos analizados en nuestro estudio y el del caso Eскурra fueron *C. posadasii*. Las cepas argentinas y la secuencia fúngica del material de Eскурra también difieren de la cepa Silveira por la mutación de C→G en la posición 1228 del gen *Ag2/PRA*¹⁷. Esto coincide con lo previamente informado por Peng et al.¹⁶ para las cepas argentinas; esta mutación no se observa en los *C. posadasii* aislados de pacientes de Tucson,

EE.UU., pero sí está presente con frecuencia en aislamientos de pacientes de México¹⁷.

Para la identificación de especies de *Coccidioides*, la técnica de amplificación descrita por Umeyama et al.¹⁸ presenta como características sencillez en su ejecución y alta especificidad. Esta técnica nos permitió confirmar la identidad de las cepas y aislamientos utilizados en el trabajo, pero desafortunadamente requiere una cantidad de ADN de 10 ng y mayor integridad del mismo, características que no fueron cumplidas por el ADN obtenido de los tejidos de Escurra, por lo cual se recurrió a la técnica de PCR-anidada.

El Dr. Eliseo Cantón, en la discusión del trabajo: "Psorospermiosis humana y experimental"⁹ presentado por Posadas en el Primer Congreso Científico Latinoamericano, realizado en Buenos Aires en 1898, propone que el parásito (aún considerado un protozoario) sea llamado *Posadasia esteriformis*, haciendo honor a su descubridor; sin embargo, es recientemente cuando la nueva especie descrita del hongo es denominada *C. posadasii* en honor al médico argentino⁴. A más de 100 años de la descripción del primer caso de coccidioidomicosis, las piezas del paciente Escurra conservadas por el Museo de Patología nos permiten realizar una contribución a la investigación científica identificando como *C. posadasii* al agente involucrado en el primer caso de coccidioidomicosis, reconocido histórica y mundialmente.

Bibliografía

- Spinello IM, Muñoz A, Johnson RH. Pulmonary coccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; 29: 166-73.
- Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D. Epidemiologic, Clinical, and Diagnostic Aspects of Coccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 26-30.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Coccidioidomycosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE (eds). *Medical Mycology*. Philadelphia-London, Lea & Febiger, 1992, p 356-96.
- Fisher M C, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002; 94: 73-84.
- Ramani R, Chaturvedi V. Antifungal susceptibility profiles of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* from endemic and non-endemic areas. *Mycopathologia* 2007; 163: 315-9.
- Tintelnot K, De Hoog GS, Antweiler E, et al. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol* 2007; 45: 385-93.
- Posadas A. Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. *Círculo Med Argent* 1892; 5: 585-7.
- Wernicke R. Ueber einen Protozoen-befund bei Mycosis fungoides. *Centralbl F Bakt* 1892; 12: 859-61.
- Arce J. Obras completas de Alejandro Posadas. Imprenta de la Universidad de Buenos Aires, 1928, 302 pp.
- Rixford E, Gilchrist TC. Two cases of protozoan (coccidioidal) infection of the skin and other organs. *J Hopkins Hosp Rep* 1896; 1: 209-10.
- Ophüls W, Moffit HC. A new pathogenic mould formerly described as a protozoan: *Coccidioides immitis* (*Coccidioides pyogenes*). Preliminary report. *Philadelphia Med J*. 1900; 5: 1471-2.
- Ophüls W, Moffit HC. Further observation on a pathogenic mold formerly described as a protozoan *Coccidioides immitis* (*Coccidioides pyogenes*). *J Exp Med* 1905; 6: 443-86.
- Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3040-2.
- Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Molecular Ecology* 1997; 6: 781-6.
- Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5478-82.
- Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ, Galgiani JN. Prolinerich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J Infect Dis* 1999; 179: 518-21.
- Bialek R, Kern J, Herrmann T, et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 778-83.
- Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1859-62.
- Castañón-Olivares LR, Güereña-Elizalde D, González-Martínez MR, Licea-Navarro AF, González-González GM, Aroch-Calderón A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1111: 326-35.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. In: Fleming D, Richardson JH, Tulis JJ, Vesley D, (ed) *Laboratory Safety Principles and Practices* ASM Press. Washington D.C. 1995; p 293-354.
- Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate amortiguador or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin fixed sections. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1599-604.
- Perrotta D, Vivot W, Lee W, et al. Producción de antisueros fúngicos específicos en conejos. *Rev Argent Microbiol* 1998; 30: 115-21.
- Hall TA. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-8.
- Kaiserling C. Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin 1897; 147.