

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Análisis de la distribución actual de *Coccidioides* spp. en
muestras de suelo de Baja California, México**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Jessica Paulette Segovia Mota

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Jessica Paulette Segovia Mota

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Codirectora de tesis

Dr. Bernardino Ricardo Eaton González
Codirector de tesis

Dra. Jimena Carrillo Tripp

Dr. Domingo Martínez Soto

Dra. Zayre Ivonne González Acevedo



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez-Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jessica Paulette Segovia Mota** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Análisis de la distribución actual de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo de Baja California, México

Resumen aprobado por:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Codirectora de tesis

Dr. Bernardino Ricardo Eaton González
Codirector de tesis

La coccidioidomycosis, es una enfermedad infecciosa reemergente en el continente americano, causada por dos especies de hongos ascomicetos del género *Coccidioides*. El agente causal de esta enfermedad se ha identificado en regiones áridas y semiáridas, principalmente en el suroeste de Estados Unidos, América Central y América del Sur, así como en diversas partes del norte de México, como Baja California. A pesar de los altos índices de incidencia de esta enfermedad, se han obtenido pocos puntos positivos de muestras ambientales probablemente por la distribución no uniforme de *Coccidioides* spp. en suelos, la presencia de inhibidores, la baja cantidad de ADN ambiental y a que los métodos actuales para la detección requieren de técnicas de secuenciación y de tiempo prolongado. En este trabajo, se propuso el uso de dos técnicas de detección: la PCR anidada y la técnica Droplet Digital PCR (ddPCR). Se tomaron muestras de suelo de madrigueras activas tanto en sitios muestreados anteriormente donde ya se había demostrado la presencia de *Coccidioides* spp., como en sitios no muestreados previamente. Se obtuvieron 20 muestras de Valle de las Palmas, 26 de San José de la Zorra, 18 muestras de Rancho Carrizo y 12 muestras de Rancho Golondrinas. Se extrajo ADN ambiental, y se realizó una PCR anidada usando oligonucleótidos dirigidos a amplificar la región ITS1 para detectar la presencia de *Coccidioides*. Se determinaron parámetros fisicoquímicos tales como materia orgánica, humedad, granulometría, conductividad eléctrica y pH, para evaluar si existe una correlación entre estas variables y la presencia o ausencia del hongo. Finalmente, se desarrollaron mapas de prevalencia con el fin de conocer de manera general la distribución actual de sitios con identificación positiva del hongo. Se obtuvo una mayor cantidad de muestras positivas con la técnica de ddPCR que con la PCR anidada, lo que sugiere que la primera es una técnica mucho más sensible y eficaz. De todos los parámetros ambientales evaluados, el pH fue el que obtuvo mayor correlación con la muestra. Sin embargo, es necesario seguir realizando estudios que incluya variables ambientales, así como de suelo para obtener un mejor conocimiento del nicho ecológico de *Coccidioides* spp.

Palabras clave: *Coccidioides* spp., PCR, ddPCR, muestras de suelo

Abstract of the thesis presented by **Jessica Paulette Segovia Mota** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences.

Analysis of the current distribution of *Coccidioides* spp. in soil samples from Baja California, Mexico

Abstract approved by:

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
Thesis codirector

Dr. Bernardino Ricardo Eaton González
Thesis codirector

Coccidioidomycosis, also known as Valley Fever, is a reemerging infectious disease in the American continent, caused by two species of ascomycetes fungi of the genus *Coccidioides*. The causal agent of this disease has been identified in arid and semiarid regions, including the southwestern United States, Central America and South America, as well as in diverse parts of northern Mexico, like Baja California. Despite the high incidence rates of this disease, few positive points have been identified from environmental samples. This may be due to the non-uniform distribution of *Coccidioides* spp. in soils, the presence of inhibitors, the low amount of environmental DNA, and the fact that current methods for detection, mainly through DNA analysis, require sequencing techniques and long time. In this study, the use of two detection techniques was proposed: nested PCR and Droplet Digital PCR (ddPCR). Soil samples were taken from active burrows at previously sampled sites (Valle de las Palmas and San José de la Zorra), where the presence of *Coccidioides* spp. had already been demonstrated, as well as from previously unsampled sites. In total, 20 samples were obtained from Valle de las Palmas, 26 from San José de la Zorra, 18 samples from Rancho Carrizo, and 12 samples from Rancho Golondrinas. Physicochemical parameters such as organic matter, humidity, granulometry, electrical conductivity, and pH were determined to evaluate whether there is a correlation between these variables and the presence or absence of the fungus. Finally, environmental prevalence maps were developed based on the results of previous sampling sites and those obtained in this work, to generally know the current distribution of sites with positive identification of the fungus. More positive samples were obtained with the ddPCR technique than with nested PCR, suggesting that the first approach is a much more sensitive and effective technique. Of all the environmental parameters evaluated, pH was the one that presented the highest correlation with the sample. However, it is necessary to carry out additional studies including environmental and soil variables to obtain a better knowledge of the ecological niche of *Coccidioides* spp.

Keywords: *Coccidioides* spp., PCR, ddPCR, soil samples

Dedicatoria

A mi familia que estuvo presente aun en la distancia y confiando en todo este proceso, a mis amigos lejanos y cercanos, porque tengo la fortuna de tener a los mejores. A Raúl por su amor, tiempo y paciencia y a mi niña: mi regalo inesperado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de manutención otorgada para poder realizar mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por permitirme formar parte del Posgrado en Ciencias de la Vida, y darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, así como por el uso de las instalaciones durante todo el desarrollo del proyecto. También agradezco al Departamento de Ciencias de la Tierra por brindarme la oportunidad de utilizar su equipo para poder llevar a cabo los experimentos.

Al MCR Centre for Medical Mycology por brindarme la oportunidad de asistir a su congreso por medio de la beca y poder presentar mi trabajo.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Meritxell Riquelme, por abrirme sus puertas de su laboratorio al ir a tocar a su puerta (literalmente), por darme la oportunidad de realizar este gran y bonito proyecto y confiar en mí a pesar de que se atravesó algo inesperado, problemas en el laboratorio al no salir las cosas, y demás. Gracias infinitas por su conocimiento, su paciencia, consejo, y apoyo en todos los sentidos.

A mi codirector de tesis, el Dr. Ricardo Eaton, por su entusiasmo para realizar este proyecto, el apoyo brindado durante las salidas de campo, así como en el congreso, por su paciencia al checar todas las variables analizadas y por el tiempo brindado para poder concluir a tiempo.

A mi comité sinodal, el Dr. Domingo por brindarme cepas de su laboratorio y sus consejos, así como por el tiempo; la Dra. Zayre González Acevedo por abrirme las puertas en su laboratorio en Ciencias de la Tierra y a la Dra. Jimena Carrillo Tripp por sus múltiples consejos durante los experimentos, por siempre resolver mis dudas y, sobre todo, por emocionarse conmigo cuando salí, es una gran persona en todos los sentidos.

Al Oceanólogo Gabriel Rendón por estar al pendiente y brindarme la enseñanza durante todo el procesamiento de las muestras, así como por las pláticas que surgieron durante la elaboración del proyecto. A Karen García e Idalia Montesinos por su gran apoyo durante toda la parte experimental, que sin ellas mucho de este trabajo no hubiera sido posible, gracias infinitas.

A todo el Riquelme Lab: Juanpy, Daniel, Alexis, Sammy, Elías, Mony que se han convertido en muy buenos amigos, por siempre estar dispuestos a ayudarme aun y cuando tuviera la más mínima duda, ser un gran equipo de trabajo y principalmente por las risas durante todas las sesiones de labmeeting. Un agradecimiento especial a Lolis, porque estuvo desde que comenzamos este proyecto, preocupándose cuando no salían las cosas y emocionándonos hasta brincar cuando salieron. Muchas gracias por ser tan buena compañera e incluso amiga, te tengo un gran cariño.

A mis amigos que tuve la oportunidad de conocer en CICESE y literalmente me adoptaron: Yahis, gracias por tu ayuda y por tu compañerismo siempre, de que se pudo se pudo. Cecy, gracias por tu tiempo, tu cariño, tu carisma y cada palabra de aliento. Eres un ejemplo y te admiro mucho por todo lo que has logrado. Gis, gracias por tus enseñanzas, cariño y tiempo de calidad, así como por tus pláticas, te admiro muchísimo y te quiero todavía más y a Hugo, gracias por tus risas (que nunca faltaron), tus consejos, tus enseñanzas y tiempo, te admiro en todos los sentidos amigo. Infinitas gracias por aceptarme y acoplarme, literalmente me rescataron de una banca, jajaja. Los quiero muchísimo y se han convertido en grandes amigos y en una parte importante de mi vida.

A mis amigos que, a pesar de la distancia, siempre estuvieron al pie del cañón y parece como si el tiempo nunca faltara: Alme, Danya, Jessi, Josué, Den y Ana. Gracias infinitas por su amistad tan sincera, tan duradera y por ser los mejores amigos que alguien puede tener. Los extraño muchísimo. Principalmente gracias a Ana por ser mi hermana y siempre estar al pendiente de todo, te extraño mucho.

A mi familia de aquí, mis suegros, por la ayuda y el ánimo brindado durante todo este proyecto, así como por el apoyo con Helena. A toda mi familia que está lejos, pero siempre en mi corazón: mi Mary, César, Fer, Julia, Daniel, Chiquis y mis sobrinos. Ustedes forman parte de uno de mis pilares más importantes. Gracias por sus consejos a pesar de la distancia, que casi no se siente porque siempre están presentes. A mi papá por siempre echarme porras a pesar de que a veces sentía que ya no quería, eres el mejor amigo de todos. A mi mamá, mi jefaza, que hoy más que nunca es un ejemplo de admiración total en mi vida. Te amo y extraño diario. Gracias a todos porque sin ustedes, nada sería posible.

Finalmente, a mi apoyo diario, Raúl. Gracias por echarme porras cuando me quería rendir, por aguantarme cuando estaba cansada porque no salían las cosas y no dejarme caer. Te amo y agradezco muchísimo tu presencia en mi vida.

Y a mi niña: mi Hele. Que en realidad yo vine por un título y salí con dos. Como siempre digo, eres mi regalo inesperado y mi sorpresa favorita. Todo lo que hago ahora será por y para ti. Te adoro.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Biología y Ciclo de vida de <i>Coccidioides</i> spp.....	1
1.1.2 Nicho ecológico de <i>Coccidioides</i> spp.....	4
1.1.3 Región ITS.....	4
1.1.4 Droplet Digital PCR (ddPCR)	5
1.1.5 Estudios relacionados.....	6
1.2 Justificación	8
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general.....	8
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología	10
2.1 Sitios de muestreo.....	10
2.2 Toma de muestras.....	11
2.3 Extracción de ADN de las muestras tomadas del suelo	11
2.4 Diagnóstico de <i>Coccidioides</i> spp. por PCR anidada	12
2.5 Diagnóstico de <i>Coccidioides</i> spp. por ddPCR.....	13

2.6	Procesamiento de muestras de suelo	15
2.6.1	Contenido de humedad.....	15
2.6.2	Contenido de materia orgánica.....	16
2.6.3	Textura del suelo	16
2.6.4	Determinación del pH del suelo	17
2.6.5	Determinación de conductividad eléctrica	17
2.6.6	Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía.....	18
2.6.7	Elaboración de mapas de diagrama de superficie	18
2.6.8	Análisis de correlación.....	18
2.7	Elaboración de mapas de prevalencia ambiental	19
Capítulo 3.	Resultados.....	20
3.1	Sitios de muestreo.....	20
3.2	Toma de muestras.....	22
3.3	Extracción de ADN ambiental de las muestras tomadas del suelo	23
3.4	Diagnóstico de <i>Coccidioides</i> spp. por PCR anidada	27
3.5	Diagnóstico de <i>Coccidioides</i> spp. por ddPCR.....	29
3.6	Procesamiento de muestras de suelo	35
3.6.1	Contenido de humedad.....	35
3.6.2	Contenido de materia orgánica.....	36
3.6.3	Textura del suelo	37
3.6.4	Determinación del pH del suelo	39
3.6.5	Determinación de conductividad eléctrica	41
3.6.6	Análisis de correlación.....	42
3.7	Elaboración de mapas de prevalencia ambiental	45
Capítulo 4.	Discusión	48
4.1	PCR anidada y ddPCR	48
4.2	Parámetros de suelo	49

4.3	Mapas de prevalencia ambiental	52
Capítulo 5.	Conclusiones y Recomendaciones.....	53
	Literatura citada	54
	Anexos	59

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Coccidioides</i> spp. Crecimiento de <i>Coccidioides</i> en forma de micelio hasta convertirse en artocronidios, los cuales serán inhalados por un hospedero susceptible. Posteriormente, pasarán al ciclo parasitario convirtiéndose en esférulas. Las esférulas contienen las endosporas que pueden permanecer en el tejido pulmonar o diseminarse a distintas partes del cuerpo. Obtenido de Taylor y Barker, 2019.	2
Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreo en Baja California, México (Valle de las Palmas, Rancho las Golondrinas, Rancho el Carrizo y comunidad San José de la Zorra).	10
Figura 3. Mezcla de reacción con todos los componentes (20 μ L) y aceite generador de gotas (70 μ L) cargados en un cartucho para llevarse al generador. Se toman 40 μ L para colocarse en la pared de la placa de PCR de 96 pocillos. Se lleva a cabo la amplificación y posteriormente, se transfiere al lector de gotas donde se analizan los resultados.....	15
Figura 4. Triángulo de las texturas. Se utiliza para determinar el nombre de la textura del suelo. Cada textura corresponde a valores específicos de arcilla, limo y arena. Obtenido de Soil Science Division Staff. 2017.....	17
Figura 5. Puntos de muestreo del sitio 1 en Valle de las Palmas, Baja California.....	20
Figura 6. Puntos de muestreo de los sitios 2 y 3. A) Rancho el Carrizo, Baja California. B) Rancho las Golondrinas, Baja California.....	21
Figura 7. Puntos de muestreo del sitio 4 en la comunidad de San José de la Zorra, Baja California....	22
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 20.....	23
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de Rancho el Carrizo. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 18.....	24
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de Rancho las Golondrinas. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 12.	25
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de la comunidad de San José de la Zorra. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 26.	26
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio. Resultados de la amplificación de la región ITS1 de las muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera GeneRuler™	

(100 pb), muestras, C+: control positivo (ADN de <i>C. posadasii</i>), C-: control negativo (agua HPLC).	28
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1 y 2%) teñido con bromuro de etidio. A) Resultados de la amplificación de la región ITS de dos muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras, Asp: <i>A. fischeri</i> , C+: control positivo (<i>C. posadasii</i>), C-: control negativo (agua HPLC). B) Resultados de la amplificación de la región ITS1 de dos muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras, Asp: <i>A. fischeri</i> , C+: control positivo (<i>C. posadasii</i>), C-: control negativo (agua HPLC).	28
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados de la amplificación de la región ITS1 con oligonucleótidos para ddPCR. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras 1, 9, 10, 19 y 20. C+: control positivo (<i>C. posadasii</i>), muestra 17 como control negativo.	30
Figura 15. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de Valle de las Palmas. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).	30
Figura 16. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de Valle de las Palmas por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/μL).	31
Figura 17. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de Rancho el Carrizo. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).	32
Figura 18. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de Rancho el Carrizo por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/μL).	32
Figura 19. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de Rancho las Golondrinas. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).	33
Figura 20. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de Rancho las Golondrinas por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/μL).	33
Figura 21. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de la comunidad de San José de la Zorra. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).	34
Figura 22. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de la comunidad de San José de la Zorra por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/μL).	34
Figura 23. Porcentaje de humedad en muestras de suelo de los sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras (P>0.05).	35
Figura 24. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes a la humedad. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D)	

- SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras..... 36
- Figura 25. Porcentaje de materia orgánica en muestras de suelo de los Sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P>0.05$), el asterisco (*) indica diferencia significativa entre muestras ($P<0.05$)..... 36
- Figura 26. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes a la materia orgánica. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras..... 37
- Figura 27. Clasificación de tipos de suelo para todos los sitios muestreados. El mayor porcentaje de sitios muestreados presentó suelos de tipo arenoso franco (48.89%)..... 39
- Figura 28. Valores de pH en muestras de suelo de los sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P>0.05$), los asteriscos (**) y (****) indican diferencia significativa entre muestras ($P<0.01$ y $P<0.0001$ respectivamente). 40
- Figura 29. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes al pH. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras. 40
- Figura 30. Valores de Conductividad Eléctrica en muestras de suelo de los sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P>0.05$), el asterisco (*) y (**) indican diferencia significativa entre muestras ($P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente). 41
- Figura 31. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes a la conductividad eléctrica. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras..... 41
- Figura 32. Correlación de variables ambientales en todos los sitios de muestreo. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables. Valores de X indican correlaciones no significativas entre variables. 42
- Figura 33. Correlación de variables ambientales en Valle de las Palmas. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre variables..... 43
- Figura 34. Correlación de variables ambientales en Rancho el Carrizo. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables. 43
- Figura 35. Correlación de variables ambientales en Rancho las Golondrinas. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables..... 44

Figura 36. Correlación de variables ambientales en la comunidad San José de la Zorra. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables.	44
Figura 37. Sitios positivos y negativos mediante PCR anidada y ddPCR en Valle de las Palmas, Baja California. A) Sitios negativos y positivos por PCR Anidada, B) Sitios negativos y positivos por ddPCR.	45
Figura 38. Sitios negativos y positivos por ddPCR. A) RC= Rancho el Carrizo, B) RG= Rancho las Golondrinas, C y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra.....	46
Figura 39. Ubicación de sitios positivos con base en muestreos previos y el actual en Valle de las Palmas, Baja California.	47
Figura 40. Ubicación de sitios positivos con base en muestreos previos y el actual en San José de la Zorra, Baja California.....	47

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR anidada.....	13
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la reacción ddPCR.	13
Tabla 3. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 1 (Valle de las Palmas)..	23
Tabla 4. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 2 (Rancho el Carrizo). ...	25
Tabla 5. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 3 (Rancho las Golondrinas).	26
Tabla 6. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 4 (Comunidad de San José de la Zorra).	27
Tabla 7. Especies de hongos identificados por secuenciación de los amplicones de la región ITS1 posterior a la extracción de ADN ambiental en cinco muestras de suelo.	29
Tabla 8. Porcentajes de arcilla, limo y arena y su clasificación para las muestras de Valle de las Palmas. El color rojo indica las muestras positivas por ddPCR.....	37
Tabla 9. Parámetros de los 20 puntos de muestreo de Valle de las Palmas, Baja California.	59
Tabla 10. Parámetros de los 18 puntos de muestreo de Rancho Carrizo, Baja California.....	61
Tabla 11. Parámetros de los 12 puntos de muestreo de Rancho Golondrinas, Baja California.	63
Tabla 12. Parámetros de los 26 puntos de muestreo de Rancho San José de la Zorra, Baja California.	64
Tabla 13. Tabla de datos sobre los resultados obtenidos de las muestras de suelo por ddPCR.	66

Capítulo 1. Introducción

La coccidioidomicosis, mejor conocida como Fiebre del Valle, es una enfermedad infecciosa reemergente en el continente americano (Kirkland & Fierer, 1996), la cual es causada por dos especies de hongos ascomicetos del género *Coccidioides* (Nguyen et al., 2013). Esta enfermedad, afecta principalmente a mamíferos, incluyendo a humanos, e incluso a reptiles y es considerada como una enfermedad endémica debido a que se presenta en regiones áridas y semiáridas (Baptista-Rosas et al., 2007; Baptista-Rosas et al., 2011). Para ser considerada una región endémica para coccidioidomicosis, la región debe registrar *a*) una prevalencia de la infección superior al 5 %, *b*) el agente causal ha de poderse aislar del ambiente y *c*) han de existir reportes de casos clínicos producidos por la micosis (Laniado-Laborín et al., 1991). Se conocen dos especies, *Coccidioides immitis* y *C. posadasii* (Nguyen et al., 2013). *C. immitis* se ha encontrado principalmente en California, en Estados Unidos y *C. posadasii* en el sur de Arizona, Nuevo México, Texas, América Central, y América del Sur (Fisher et al., 2002; Nguyen et al., 2013 Luna-Isaac et al., 2014), así como en distintos estados de México tales como Sonora, Nuevo León, Coahuila, y Baja California, siendo considerada en actualidad como una de las micosis más importantes en Norteamérica (Baptista-Rosas y Riquelme, 2007; Baptista-Rosas et al., 2011; Barker et al., 2012).

Las regiones áridas y semiáridas en donde principalmente se distribuye este hongo, constituyen en la actualidad un tercio de la superficie total del planeta (Malagnoux et al., 2007). Para el caso de México, la Comisión Nacional de Zonas Áridas estima que las regiones áridas y semiáridas constituyen el 41 % de la superficie del territorio (Medrano, 2012). El incremento en la prevalencia en estas regiones se debe a los cambios por diversas actividades antropogénicas, incluyendo el cambio de uso de suelo y a su vez, al aumento de temperaturas causado por el cambio climático (Vargas-Gastélum et al., 2015).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Biología y Ciclo de vida de *Coccidioides* spp.

En cuanto a la clasificación taxonómica, *Coccidioides* pertenece al Phylum Ascomycota, Sub-phylum Pezizomycotina, Clase Eurotiomycetes, Orden Onygenales, y Familia Onygenaceae. Ambas especies de *Coccidioides* son dimórficas, es decir, presentan dos formas de crecimiento: micelial y en forma de

esférula. Durante la fase saprobica, las hifas forman esporas (artroconidios) que son las encargadas de la dispersión por acción del viento. Estas esporas se encuentran de forma latente en condiciones áridas y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en regiones áridas y semiáridas. Al ser inhaladas por el hospedero, se forman las estructuras conocidas como esférulas parasitarias en un hospedero susceptible. Dichas esférulas contienen las endosporas. Las esférulas alcanzan su madurez de 5 a 10 días, y al romperse, las endosporas (de un tamaño de 1 a 3 micrómetros) son liberadas afectando al sistema inmunitario del hospedero (Figura 1). Las endosporas pueden permanecer en el tejido pulmonar o diseminarse a distintos sitios del cuerpo como el hígado, bazo, ganglios linfáticos, huesos, etc. con presencia de posible daño articular, lesiones cutáneas o meningitis (Kolivras y Comrie, 2003; Taylor & Barker, 2019).

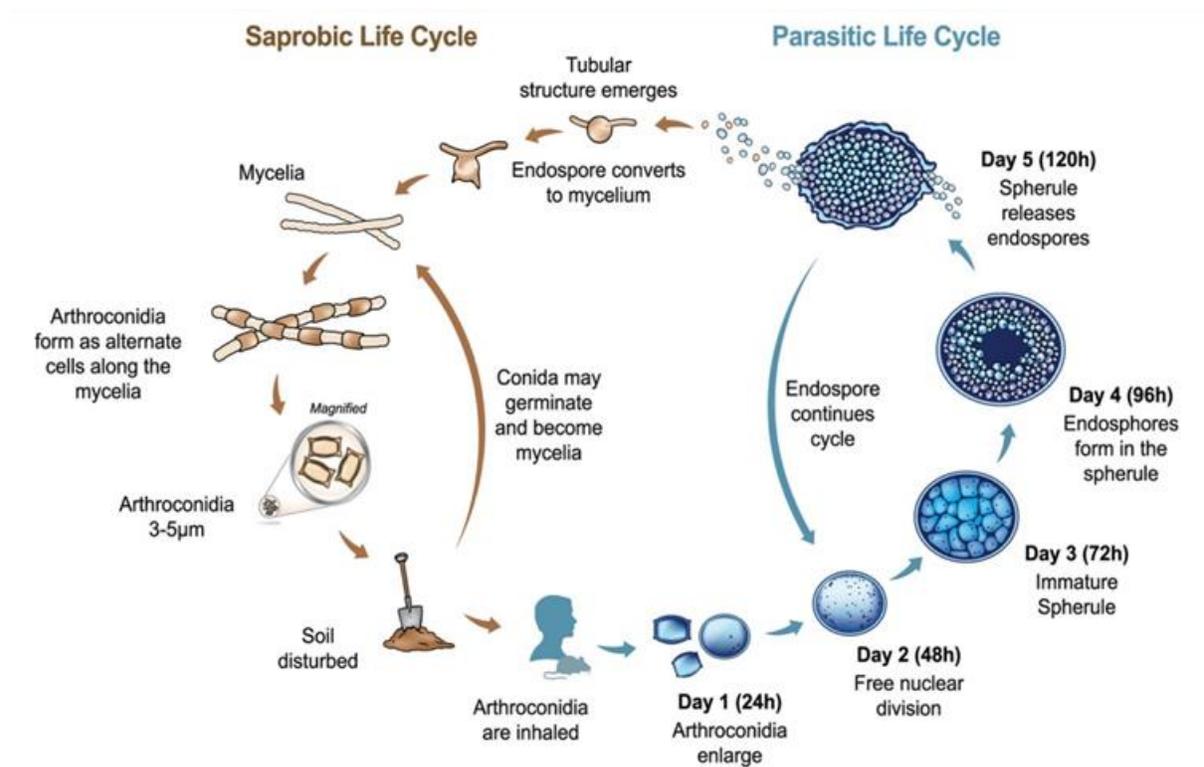


Figura 1. Ciclo de vida de *Coccidioides* spp. Crecimiento de *Coccidioides* en forma de micelio hasta convertirse en artroconidios, los cuales serán inhalados por un hospedero susceptible. Posteriormente, pasarán al ciclo parasitario convirtiéndose en esférulas. Las esférulas contienen las endosporas que pueden permanecer en el tejido pulmonar o diseminarse a distintas partes del cuerpo. Obtenido de Taylor y Barker, 2019.

Los reportes de incidencia de esta enfermedad estiman que para Estados Unidos existen entre 150,000 y 350,000 casos por año (McCotter et al., 2018). Sin embargo, estas cifras pueden resultar erróneas debido a que: 1) muchos de estos casos no se reportan ya que la infección puede ser asintomática, 2) los diagnósticos son erróneos, o 3) la atención médica es insuficiente (Mead et al., 2022).

En México, se desconoce la incidencia de la enfermedad ya que existen pocas investigaciones coordinadas, además del hecho que el reporte de casos de coccidioidomycosis dejó de ser obligatorio a partir de 1995 en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sin embargo, existen estimaciones que sugieren que los casos de coccidioidomycosis anualmente ascienden a 1,500 casos de coccidioidomycosis primaria (en el tejido pulmonar causando síntomas como fiebre, tos y fatiga) y 15 casos de coccidioidomycosis diseminada (Galgiani et al., 2005; Baptista-Rosas y Riquelme, 2007; Luna-Isaac et al., 2014).

A pesar de la evidencia presentada entre los años 1988 y 1994 y del incremento de las tasas de incidencia anuales mayores que otras enfermedades endémicas, como la tripanosomiasis, histoplasmosis y la leishmaniasis, gran parte del sector salud continúa considerando a la coccidioidomycosis como una enfermedad poco frecuente (Baptista-Rosas y Riquelme, 2007).

Pese a los altos índices de incidencia de esta enfermedad en Estados Unidos, la evidencia ambiental para *Coccidioides* spp. permanece poco clara, ya que los aislamientos positivos a partir de muestras ambientales de regiones endémicas son escasos en comparación con los aislamientos a partir de muestras clínicas; esto, por falta de muestreos dirigidos, por el poco conocimiento de su nicho ecológico y su papel en la comunidad microbiológica del suelo, por la contaminación debido al crecimiento de distintos hongos patógenos y bacterias, y a que los aislamientos en muestras de suelo mediante cultivo resultan un método impredecible y complicado (Georg, et al., 1951; Greene et al., 2000; Baptista-Rosas et al., 2007; Baptista-Rosas et al., 2011).

Se tiene registro de los primeros estudios realizados para la detección de *Coccidioides* aislados de muestras de suelo, así como de 21 muestras positivas obtenidas de *C. immitis* en muestras de suelo mediante el método de inoculación intraperitoneal en ratones (Stewart & Meyer, 1932; Cairns et al., 2000). Por otro lado, se pudieron aislar solamente cuatro muestras positivas de 720 obtenidas y analizar mediante técnicas de cultivo, extracción de ADN y PCR (Greene et al., 2000).

A causa del incremento en el uso de técnicas moleculares, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y distintas técnicas de secuenciación han permitido realizar de manera más efectiva la detección de las especies de *Coccidioides*, así como determinar la distribución potencial del patógeno en su ambiente (Baptista-Rosas et al., 2011; Catalán-Dibene et al., 2014; Vargas-Gastélum et al., 2015).

1.1.2 Nicho ecológico de *Coccidioides* spp.

Se ha encontrado evidencia de *Coccidioides* en madrigueras de roedores (Kollath et al., 2020). A su vez se ha postulado que los roedores proporcionan las condiciones de humedad, de temperatura estable y los nutrientes necesarios para el desarrollo de *Coccidioides*, sin que presenten algún signo o síntoma de la enfermedad, sino que fungen como hospederos o reservorios fúngicos (Emmons & Ashburn, 1942; Nguyen et al., 2013; Catalán-Dibene et al., 2014). Sin embargo, esta enfermedad puede afectar tanto a humanos como a algunos otros mamíferos incluyendo perros, gatos y ganado (Kolivras et al., 2001).

Entre los factores que pueden influir en el desarrollo de *Coccidioides* spp., destacan la temperatura ambiental, la duración de la precipitación, temperatura y humedad del suelo, alcalinidad, el contenido de materia orgánica y la competencia con otros microorganismos (Fisher et al., 2007; Weaver y Kolivras, 2018; Ocampo-Chavira et al., 2020). Asimismo, para el crecimiento del hongo, se requiere un periodo de humedad para su crecimiento en el suelo y posteriormente, un periodo de sequía con viento para su dispersión aérea (Kolivras y Comrie, 2003).

La literatura menciona que las esporas de *Coccidioides* spp. pueden sobrevivir a rangos de temperatura entre los -15°C y los 37°C por un periodo de seis meses, con rangos distintos de humedad (Friedman et al., 1956). Así mismo, Maddy y Coccozza (1964) señalan la presencia de *Coccidioides* en áreas en donde la temperatura máxima es alrededor de 25°C, una temperatura mínima de 1.7°C y una precipitación anual de 508 mm. En condiciones de laboratorio, la temperatura óptima de crecimiento va entre los 20°C y 40°C (Fisher et al., 2007).

A su vez, se sugiere que *Coccidioides* spp. al adaptarse a distintos rangos de temperatura, puede sobrevivir a estos ambientes en comparación con sus antagonistas (Maddy, 1965).

1.1.3 Región ITS

Las técnicas para la detección de especies de hongos basadas en la biología molecular, como por ejemplo la extracción de ADN seguida de amplificación por PCR, han adquirido gran relevancia en la actualidad ya que su aplicación ha contribuido a la comprensión de las comunidades fúngicas del suelo en estudios basados en secuencias de ADN obtenidas de muestras ambientales, lo que ha contribuido a facilitar estudios ecológicos de comunidades del suelo (Anderson y Cairney, 2004).

El Espaciador Transcrito Interno (Región ITS) del ADN nuclear, es el marcador de código de barras de ADN utilizado para identificar distintos taxones, así como de plantillas ambientales y es considerado el marcador oficial para la identificación de especies de hongos a nivel de género y muchas veces también especie (O'Brien et al., 2005). Esta región incluye las regiones ITS1 e ITS2, que se encuentran separadas por el gen 5.8S y este se encuentra situado entre los genes 18S y 28S, por lo tanto, esta región es utilizada en una PCR anidada para reducir las posibilidades de una amplificación no específica para las especies deseadas. Además, es un método utilizado para secuenciación cuando la cantidad de ADN es baja como en el caso de sustratos ambientales (Bellemain et al., 2010; Baptista-Rosas et al., 2011).

1.1.4 Droplet Digital PCR (ddPCR)

La Droplet Digital PCR (ddPCR) es un nuevo método que se basa en la preparación de gotas a partir de una emulsión de agua con aceite, en donde cada muestra se fracciona en aproximadamente 20 mil gotas y en cada una de ellas ocurre la amplificación por PCR (Droplet Digital PCR, ddPCR, Technology, 2024.). Las gotas pueden contener una copia de la secuencia que se desea amplificar y esta nueva tecnología aumenta la posibilidad de detecta dicha secuencia (Hindson et al., 2011).

El proceso de trabajo de una ddPCR es similar al de una PCR convencional, en el que se inicia combinando las muestras de ADN, una mezcla de reacción que contiene la enzima Taq Polimerasa, dNTPs y un intercalador de DNA fluorescente (Qx200 ddPCR EvaGreen Supermix) y los oligonucleótidos. Luego, las muestras son colocadas en el sistema donde se lleva a cabo el fraccionamiento de las gotas con un volumen uniforme (BioRad QX200). Se producirán aproximadamente 20,000 gotas por muestra y estas serán sometidas a la amplificación por PCR. Posterior a la amplificación, las gotas de cada muestra se analizan mediante el conteo de las PCR positivas y negativas. Las gotas con amplificación positiva presentarán fluorescencia, lo que las distinguirá de las gotas que resultaron negativas. Finalmente, la fracción de gotas positivas y negativas se ajustará a una distribución de Poisson para determinar el número absoluto de copias de la molécula de ADN objetivo (Biorad, 2018).

Por mencionar algunos estudios utilizando esta técnica, Poh y colaboradores en 2020, evaluaron la técnica de ddPCR contra la qPCR estándar para la cuantificación de distintas especies de *Aspergillus* en las vías respiratorias humanas. De 16 muestras, la qPCR obtuvo 13 positivas (81.3 %) en comparación con la ddPCR con 15 muestras positivas (93.8 %). La técnica de ddPCR fue superior en la detección de *A. terreus* presente en bajas concentraciones.

En otro estudio, se comparó la PCR, PCR en tiempo real y la ddPCR para la medición cualitativa y cuantitativa de teliosporas de *Tilletia controversa* en muestras de suelo, donde demostraron que la ddPCR obtuvo la detección más sensible en muestras de suelo con 2.1 copias/ μ L en comparación con la PCR en tiempo real con 7.97 copias/ μ L lo que representa ser 100 veces más sensible que una PCR convencional (Liu et al., 2020).

Wang y colaboradores en 2023, realizaron una comparación de la ddPCR con qPCR para detectar y cuantificar *Verticillium nonalfalfae* y *V. albo-atrum*. Sus resultados demostraron que la ddPCR obtuvo un mejor rendimiento en la cuantificación de tejidos de campo a comparación de la qPCR (0.94 y 0.90 para raíces y tallos de alfalfa), por lo que demuestra que la ddPCR es una herramienta valiosa y más sensible en comparación con otras técnicas.

1.1.5 Estudios relacionados

En investigaciones previas, se han realizado diversos esfuerzos para aislar el hongo *Coccidioides* spp. a partir del suelo, obteniendo porcentajes bajos de muestras positivas. Entre estas aproximaciones, se incluyó la inoculación en animales de laboratorio con suspensiones del hongo provenientes directamente del suelo (Barker et al., 2012; Greene et al., 2000).

La detección de ADN de *Coccidioides* en muestras de suelo, sin llevar a cabo aislamiento del hongo, también resultó en porcentajes positivos bajos (Baptista-Rosas et al., 2011). Se analizaron por PCR anidada seguida de una PCR diagnóstica para amplificar la región ITS2 de *Coccidioides* 90 muestras de suelo en madrigueras activas de dos regiones semiáridas de Baja California, México: Valle de las Palmas (VDP) y la comunidad de San José de la Zorra (SJZ). Como referencia, también se analizaron suelos de Ensenada. Se obtuvieron 50 amplicones positivos de 170 pb. De estos, 43 provenían de VDP, 5 de SJZ y 2 de Ensenada. De los amplicones purificados y secuenciados, solo 32 (35.5 %) resultaron positivos para *Coccidioides* spp. Hubo fallos en seis reacciones de secuenciación y 12 amplicones (13.33 %) resultaron ser falsos positivos, al identificarse como otras especies. Esta falta de especificidad se atribuye a que las regiones ITS2 correspondientes a los oligonucleótidos usados están altamente conservadas entre diferentes especies de hongos (Catalán-Dibene et al., 2014; Vargas-Gastélum et al., 2015).

Estudios posteriores evaluaron mediante ELISA sueros de roedores capturados en la región de VDP que había sido anteriormente identificada como positiva mediante PCR anidada (Catalán-Dibene et al., 2014).

Se detectaron anticuerpos contra *Coccidioides* en dos especies de roedores: *Peromyscus maniculatus* y *Neotoma lepida*. Asimismo, 24 muestras de suelo se analizaron por PCR anidada, de las cuales 10 resultaron positivas para el hongo, representando un 41 %.

Posteriormente, Vargas-Gastélum y colaboradores en 2015, evaluaron la diversidad fúngica en madrigueras de roedores y suelos superficiales en invierno y verano, utilizando pirosecuenciación y PCR anidada. Aunque no se detectaron resultados positivos mediante pirosecuenciación, 11 de 40 muestras (27.5 %) fueron positivas para *Coccidioides* spp. De estas, 9 provenían de madrigueras y 2 de suelos desnudos.

En 2021, Chow y colaboradores investigaron factores asociados a la presencia de *Coccidioides* mediante qPCR y análisis químicos del suelo en el estado de Washington. Analizaron 278 muestras, de las cuales 70 (25 %) resultaron positivas. Además, identificaron una correlación entre la presencia del hongo y parámetros químicos como altas concentraciones de boro, calcio, magnesio, sodio y silicio, aunque no se encontró asociación con el pH del suelo.

Kollath y su equipo, en 2019, recolectaron 456 muestras de suelos en Arizona, tanto dentro como fuera de madrigueras. Los análisis con qPCR indicaron que 105 muestras (23 %) eran positivas para *Coccidioides* spp., de las cuales un 9.47 % provenían de suelos dentro de madrigueras, evidenciando una relación entre estas y la presencia del hongo.

En 2020, Ocampo-Chavira y colaboradores desarrollaron modelos de distribución potencial de *Coccidioides* spp. bajo condiciones climáticas actuales y futuras. Estos modelos consideraron variables bioclimáticas como temperatura media anual, isotermalidad y precipitación. Proyectaron un incremento del hábitat adecuado para el hongo hacia el año 2070, abarcando desde el sur de Los Ángeles hasta el sur de Ensenada y Tijuana, en Baja California.

Finalmente, Mead et al., en 2022, recolectaron 171 muestras de suelos en madrigueras y áreas con actividad de roedores en el norte de Arizona entre 2018 y 2020. Utilizando dos ensayos de qPCR (CocciDxQ y CocciENV), detectaron que 39 muestras (22 %) eran positivas para al menos uno de los ensayos. Sin embargo, solo 6 muestras (3.5 %) fueron positivas en ambos.

Estos estudios resaltan la complejidad de detectar y aislar *Coccidioides* spp. en el ambiente, así como la influencia de factores bioclimáticos y químicos en su distribución.

1.2 Justificación

Debido al aumento en el número de casos de coccidioomicosis, a la escasa información sobre registros de la enfermedad, a las pocas detecciones positivas en muestras ambientales debidas a la distribución no uniforme de *Coccidioides* spp., a la presencia de inhibidores en suelos, a la poca cantidad de ADN de *Coccidioides* spp. en las muestras en relación con otras especies fúngicas y a que los métodos utilizados en la actualidad requieren de técnicas de secuenciación y de mayor tiempo, el presente proyecto pretende utilizar la técnica ddPCR como método de detección de *Coccidioides* spp., por ser una técnica más sensible para su detección a partir de una pequeña muestra de suelo.

Adicionalmente, se pretende obtener registros de la presencia de este patógeno en Baja California para la creación de mapas de prevalencia ambiental que muestren la distribución actual del hongo.

1.3 Hipótesis

La técnica ddPCR será una herramienta útil, más sensible y eficaz que otras técnicas para el diagnóstico de la presencia de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo, y podrá fungir como método de diagnóstico futuro para la identificación de posibles sitios positivos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Analizar la distribución actual de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo de Baja California, México, utilizando la técnica de ddPCR para su detección.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la técnica ddPCR para la detección de *Coccidioides* spp.

- Comparar sensibilidad y eficacia de la ddPCR contra la PCR anidada para detección de *Coccidioides* spp.
- Obtener mapas de prevalencia ambiental actuales con la distribución de *Coccidioides* spp. en, Baja California.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Sitios de muestreo

Se seleccionaron cuatro sitios de muestreo, dos de ellos VDP y SJZ con identificación positiva previa a la presencia de *Coccidioides* (Cairns et al., 2000; Baptista-Rosas et al., 2011). El sitio 1, localizado en VDP, en el municipio de Tecate, Baja California, se encuentra a 280 metros sobre el nivel del mar, presenta una temperatura anual con una mínima de 4°C y una máxima de 35.2°C, veranos secos, evapotranspiración del suelo y una precipitación anual de 209 mm que ayudan al crecimiento, desarrollo y propagación del hongo (Baptista-Rosas et al., 2011; Romero-Olivares et al., 2013).

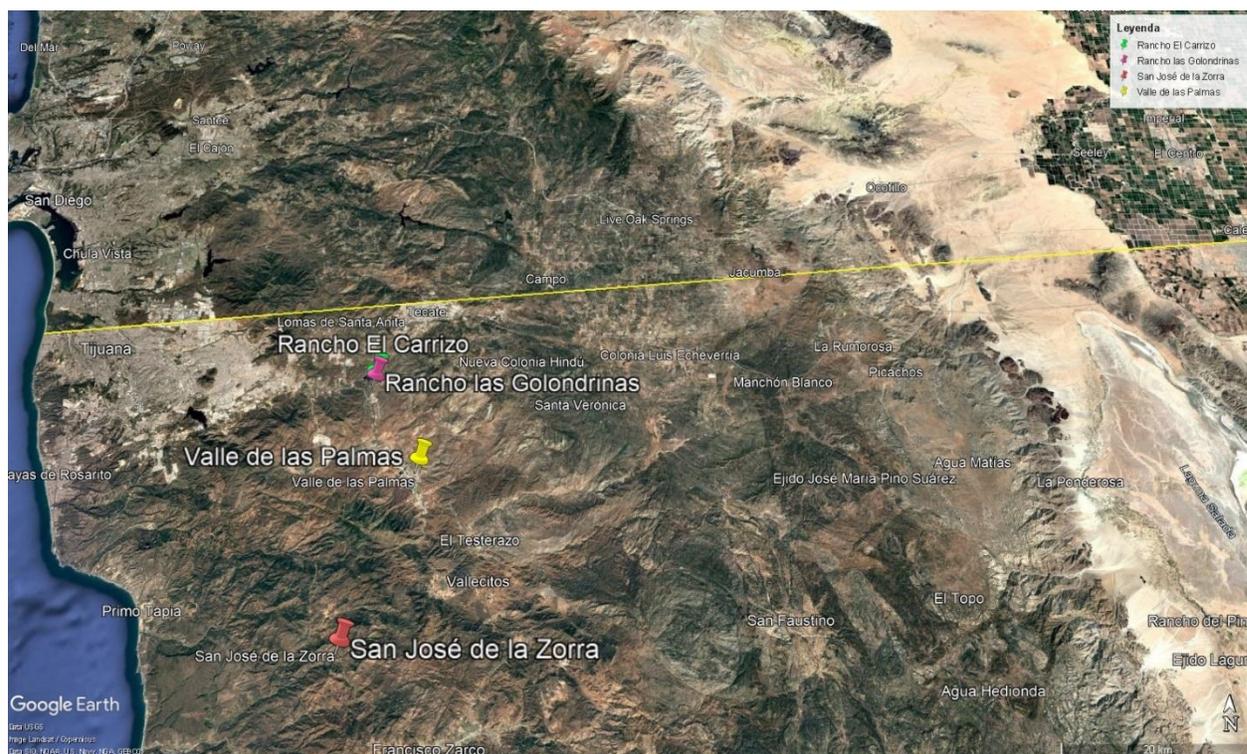


Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreo en Baja California, México (Valle de las Palmas, Rancho las Golondrinas, Rancho el Carrizo y comunidad San José de la Zorra).

El sitio 2, correspondiente al Rancho el Carrizo (RC) y Palapas Carrizo; el sitio 3, correspondiente al Rancho las Golondrinas (RG) y por último el sitio 4 en SJZ ubicado al norte del municipio de Ensenada (Figura 2), presenta clima templado y vegetación de chaparral, pastizal y bosques de encino (Banda-Castro et al., 2018).

Se tomaron un total de 76 muestras: 20 para VDP, 18 para RC, 12 para RG y 26 para SJZ.

2.2 Toma de muestras

Para la toma de las muestras de cada punto, se seleccionaron madrigueras activas, es decir, libres de telarañas o pastizal que obstruyeran la entrada y con evidencia de suelo no compactado en la entrada, lo que indicaba uso reciente. Se tomaron alrededor de 40 g de suelo y se colocaron en frascos plásticos estériles. Las muestras se tomaron del interior de la madriguera, a una distancia aproximada de 10 a 15 centímetros de la entrada. Previo al siguiente punto, la cuchara utilizada se lavó con cloro para evitar contaminación entre cada sitio. Como medida preventiva, se utilizaron guantes estériles para el manejo de las muestras, así como cubrebocas al momento de realizar la toma.

Para cada sitio, se utilizó un formato de captura de datos que contiene toda la información relacionada con el sitio de muestreo, incluyendo las coordenadas geográficas, temperatura, velocidad del viento, el tipo de vegetación predominante (matorral, chaparral, bosque, pastizal, sin vegetación-suelo desnudo-ripario), información sobre el sitio de la muestra (madriguera asociada a una roca, asociada a una planta, sin cobertura o asociación y si no se obtiene de una madriguera), textura del suelo a partir de la observación (gruesa, media, fina), compactación del suelo (compacto, no compactado), condición de humedad observable (seco, húmedo, mixto), así como imágenes panorámicas del sitio, de la condición del sitio de la muestra y una fotografía de la muestra antes de su almacenaje. Al finalizar cada punto, las muestras se colocaron en una hielera para su transporte y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

2.3 Extracción de ADN de las muestras tomadas del suelo

Para la extracción y precipitación de ADN de las muestras de suelo, se utilizó el DNeasy PowerSoil ProKit de QIAGEN, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante y utilizando 250 mg de la muestra de suelo. Como paso adicional para la extracción, cada muestra se colocó en el vórtex durante 3-4 segundos y posteriormente, en el termobloque a 70°C por 5 minutos realizando este paso por duplicado. Posteriormente, se midió la concentración del ADN extraído y la pureza de éste mediante la relación A260/280, en el espectrofotómetro Nanodrop LITE de Thermo Scientific con 1 µL de muestra. Finalmente,

se determinó el estado del ADN genómico mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Todas las muestras de ADN se ajustaron a una concentración de 10 ng/ μ L.

2.4 Diagnóstico de *Coccidioides* spp. por PCR anidada

Una vez realizada la extracción de ADN de las muestras de suelo, se llevó a cabo una primera reacción de PCR para amplificar la región ITS1-5.8s-ITS2 (aproximadamente 900 pb), usando los oligonucleótidos NS1 y NLB4 (Martin & Rygiewicz 2005; Baptista-Rosas et al., 2011).

Para la reacción, se utilizaron 4.0 μ L de GoTaq Buffer (5x), 1.6 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0.4 μ L de dNTPs (10 μ M), 1 μ L del oligonucleótido sentido (10 μ M) y 1 μ L del oligonucleótido antisentido (10 μ M), 0.25 μ L de polimerasa GoTaq (5u/ μ L) y 1 μ L de ADN como templado (10 ng/ μ L). La primera PCR consiste en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, posteriormente 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 62°C por 40 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto y para terminar, un ciclo final de elongación a 72°C por 5 minutos (Vargas-Gastélum et al., 2015). Finalmente, los productos de la PCR se confirmaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

Para la segunda amplificación, se realizó una dilución 1:10 del producto obtenido de la primera amplificación. Esta segunda reacción está diseñada para amplificar la región ITS1 (aproximadamente 120 pb) específica para *Coccidioides* spp. con los oligonucleótidos ITS1CF e ITS1CR (Vargas-Gastelum et al., 2015). Al igual que para la primera reacción de PCR, se utilizaron 4.0 μ L de GoTaq Buffer (5x), 1.6 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0.4 μ L de dNTPs (10 μ M), 1 μ L del oligonucleótido sentido (10 μ M) y 1 μ L del oligonucleótido antisentido (10 μ M) específicos para esta PCR, 0.25 μ L de polimerasa GoTaq (5u/ μ L) y 1 μ L de ADN proveniente de la dilución del amplicón purificado de la primera amplificación como templado.

El protocolo consiste en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 70°C por 40 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto y, para terminar, un ciclo final de elongación a 72°C por 5 minutos (Tabla 1). Los productos de la PCR se comprobaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Las bandas de ADN se purificaron mediante Qiaquick Gel Extraction Kit para posteriormente ser enviadas a secuenciación (Eton Bioscience Inc. San Diego, CA). Los resultados de la secuenciación se editaron manualmente utilizando el software Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR anidada.

Reacción de PCR	Oligonucleótidos
Primera amplificación PCR	Sentido NS11: 5'- GATTGAATGGCTTAGTGAGG - 3'
	Antisentido NLB4: 5'- GGATTCTCACCTCTATGAC - 3'
Segunda amplificación PCR	Sentido ITS1CF: 5'- GTGGCGTCCGGCTGCGCACCTCCCCGCGG - 3'
	Antisentido ITS1CR: 5'- GCGCAAGGCGGGCGATCCCCGGCAGCC - 3'

Como control positivo, se utilizó ADN de *C. posadasii* brindado por la Dra. Bridget Barker del Instituto de Patógenos y Microbiomas, de la Universidad del Norte de Arizona, en Estados Unidos y como control negativo, agua grado HPLC sin ADN como templado.

Para corroborar que los oligonucleótidos utilizados fueran específicos para *Coccidioides* spp., se corrió una prueba adicional con ADN del hongo *Aspergillus fischeri* proporcionado por el Dr. Domingo Martínez Soto del Departamento de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California y agua grado HPLC como controles negativos.

2.5 Diagnóstico de *Coccidioides* spp. por ddPCR

Para la detección de *Coccidioides* spp., se utilizó QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR-Bio-Rad). Para ello, se optimizó la temperatura de alineamiento, la concentración de los oligonucleótidos y se utilizó 1 µL del ADN de las muestras (10 ng/µL). Los oligonucleótidos para la ddPCR fueron los utilizados para la segunda PCR anidada, con los siguientes cambios en su extremo 5', según la recomendación del fabricante (Biorad, 2018); que la primera base no inicie con G, que tengan un mayor contenido de G y C (entre un 50 y 60 %), que en su extremo 3' terminen con G y/o C y corroborar que no formen dímeros (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la reacción ddPCR.

Reacción de PCR	Oligonucleótidos
	Sentido ITS1CF (EVA): 5'-AAGTGGCGTCCGGCTGCGCACCTCCCCGCGG- 3'
	Antisentido ITS1CR (EVA) 5' -ACGCCGCGCAAGGCGGGCGATCCCCGGC- 3'

Previo a la detección de las muestras de *Coccidioides* por ddPCR, se procedió a realizar una prueba de PCR anidada iniciando el primer ciclo de amplificación con los oligos NS1 y NLB4, seguido del segundo ciclo de amplificación con los oligonucleótidos modificados de la PCR anidada para corroborar que dichos oligonucleótidos fueran viables.

Para la mezcla de reacción, se utilizó 10.5 μL de Supermix QX200 ddPCR Evagreen (2x), el cual contiene todos los componentes que se necesitan para la reacción, a excepción de los oligonucleótidos y el templado; 0.126 μL (60 nM) de cada oligonucleótido, 9.248 μL de agua grado Milli-Q y 1 μL (10 ng) de ADN como templado, dando un total de 21 μL por reacción.

Una vez hecha la mezcla, se cargaron los 20 μL de la mezcla en un cartucho generador de gotas (DG8). Posteriormente, se agregaron 70 μL de aceite generador de gotas en cada pocillo de la fila marcada como "oil" y se colocó el sello naranja sobre el soporte para llevarlo al generador de gotas (QX200 Droplet Generator). Ya completado este proceso, se tomaron 40 μL y con cuidado, se tomaron las gotas de los pozos de la parte superior del cartucho y se colocaron en la pared de la placa de PCR de 96 pocillos. Se colocó el sello de aluminio en la placa y se colocó en el sellador de placas (PX1 Plate Sealer) con el protocolo para ddPCR (180°C durante 5 segundos). Por último, se colocó la placa sellada en el termociclador y se llevó a cabo la amplificación.

El protocolo de amplificación consistió en un ciclo inicial de activación de la enzima a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 70°C por 60 segundos; estabilización a 4°C por 5 minutos, inactivación a 90°C por 5 minutos. Finalmente, la placa de 96 pocillos se transfirió al lector de gotas (QX200 Droplet Reader) donde se realizaron los análisis correspondientes para la detección de las gotas positivas y negativas con el Software QuantaSoft (Figura 3). La fracción de gotas positivas en la muestra determina la concentración de la muestra en copias/ μL .

Para el análisis de los resultados obtenidos, se utilizó el Software QuantaSoft Analysis Pro (AP) el cual analiza los documentos generados por el Software QuantaSoft. El umbral para separar los grupos de gotas positivas y negativas se estableció manualmente tomando en cuenta los resultados de los controles negativos.

Se utilizaron 5 controles negativos: 3 NTC (agua grado HPLC) y 2 de ADN de *A. fischeri* (28.8 ng/ μL) y como control positivo, ADN de *C. posadasii* (4.8 ng/ μL).

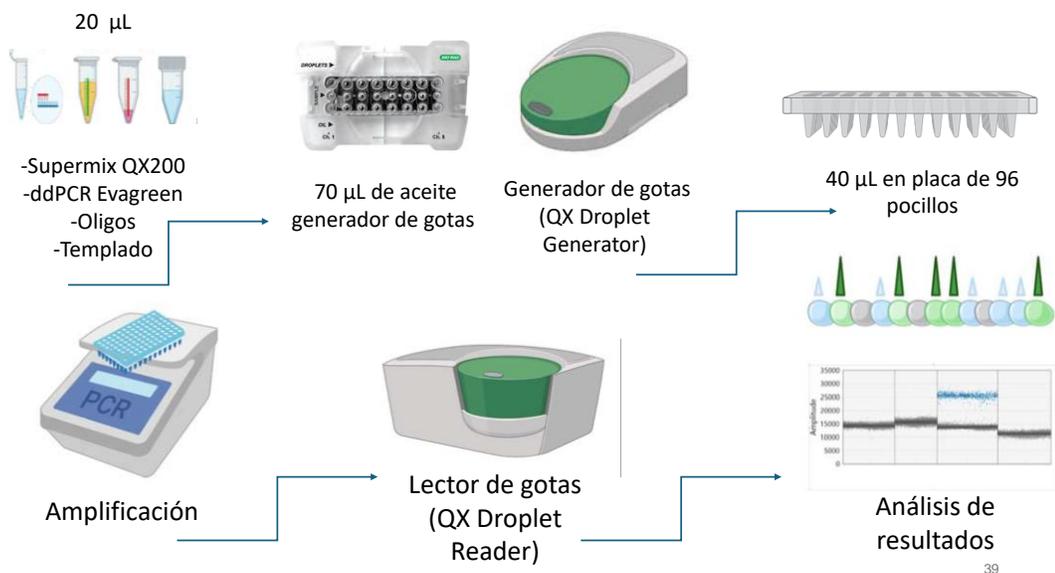


Figura 3. Mezcla de reacción con todos los componentes (20 µL) y aceite generador de gotas (70 µL) cargados en un cartucho para llevarse al generador. Se toman 40 µL para colocarse en la pared de la placa de PCR de 96 pocillos. Se lleva a cabo la amplificación y posteriormente, se transfiere al lector de gotas donde se analizan los resultados.

2.6 Procesamiento de muestras de suelo

De las muestras que resultaron positivas por la PCR Anidada, se determinó el porcentaje de humedad, porcentaje de materia orgánica, granulometría, conductividad y pH, con la finalidad de conocer las condiciones fisicoquímicas del suelo y su relación con la presencia de *Coccidioides*.

2.6.1 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad de las 20 muestras de suelo de VDP, se pesaron los crisoles para obtener un peso constante. Se tomaron entre 10 y 15 gramos de la muestra húmeda y se colocaron en los crisoles (PMH, peso muestra húmeda). Posteriormente, los crisoles se colocaron en una estufa a una temperatura de 105 °C por un lapso de 24 horas. Terminado este tiempo, las muestras se colocaron en el desecador de vacío hasta enfriar y se pesó el crisol con la muestra ya seca (PMS, peso muestra seca).

Para obtener el porcentaje de humedad, se realizaron los cálculos correspondientes mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(PMH - PMS)}{PMS} \times 100 \quad (1)$$

2.6.2 Contenido de materia orgánica

Para determinar el contenido de materia orgánica, se realizó un mismo procedimiento similar al seguido para determinar el contenido de humedad, excepto que después de tomar el PMS, las muestras se colocaron en una mufla a una temperatura de 500°C durante 2 horas. Finalizado este tiempo, se tomó el peso de la muestra calcinada (PMC). El porcentaje de materia orgánica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia orgánica} = \frac{(PMS - PMC)}{PMS} \times 100 \quad (2)$$

2.6.3 Textura del suelo

Para determinar el tipo de textura que presentaban los suelos de las muestras, se utilizó el método del hidrómetro (densímetro) o de Bouyoucos que es congruente con la NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios de muestreo y análisis.

Se pesaron alrededor de 40 gramos de las muestras de suelo. A cada muestra se le agregaron 100 mL de hexametáfosfato de sodio al 5 %. Las muestras se dejaron reposar durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se colocaron en el vaso agitador, se licuaron por 1 minuto y se vació el contenido en una probeta de 1 L. Se agregó agua destilada hasta aforar. La muestra se agitó cuidadosamente por 1 minuto (180°C).

Para medir la densidad y temperatura, se colocó el hidrómetro y el termómetro y se registró su lectura a los 40 segundos (LR40) y a las 2 horas (LR2), sin perturbar la muestra.

Para realizar los cálculos, se utilizó la tabla sugerida por la NOM-021-RECNAT-2000.

Finalmente, los porcentajes de limo, arcilla y arena se obtuvieron a partir del volumen de la probeta y de

acuerdo con el triángulo de las texturas se obtuvo la clasificación del suelo (Figura 4).

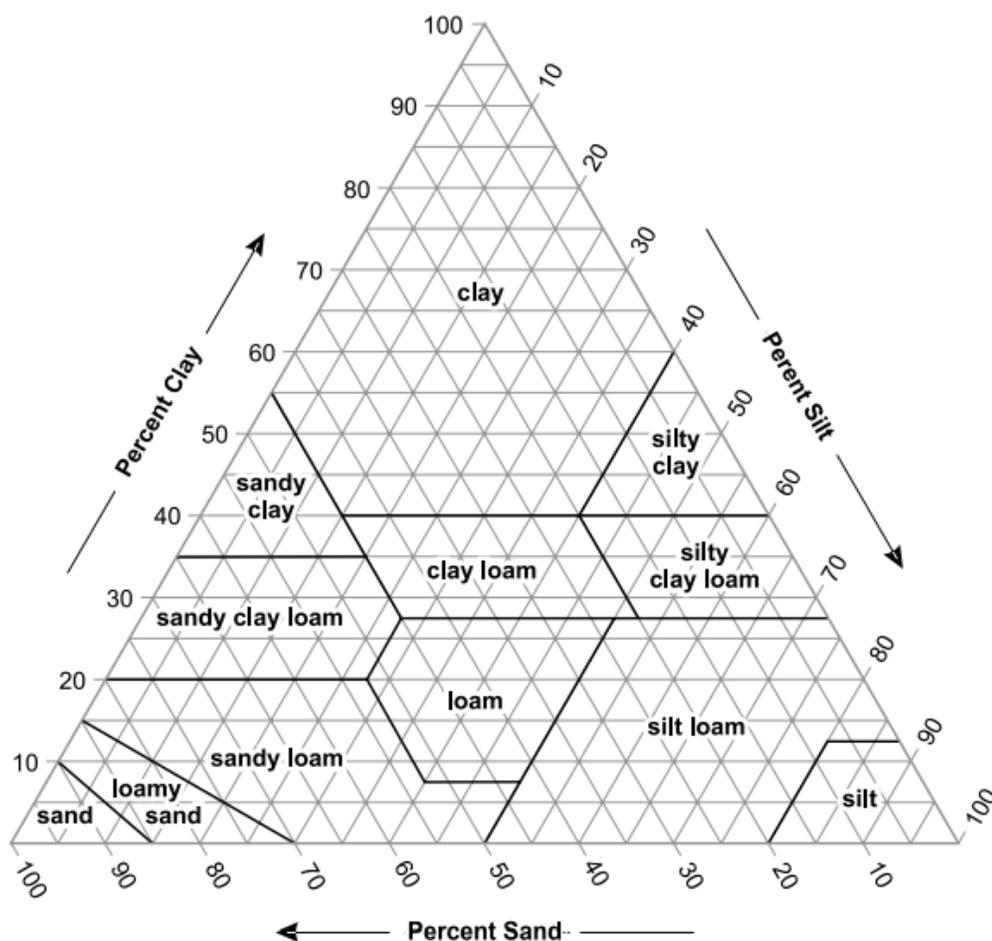


Figura 4. Triángulo de las texturas. Se utiliza para determinar el nombre de la textura del suelo. Cada textura corresponde a valores específicos de arcilla, limo y arena. Obtenido de Soil Science Division Staff. 2017.

2.6.4 Determinación del pH del suelo

Para cada muestra, se tomaron entre 10 a 15 gramos de suelo y se añadieron 30 mL de agua destilada. Las muestras se agitaron por intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. La muestra se dejó reposar y se tomó la medición directa de pH con el potenciómetro Thermo Scientific™ Orion™.

2.6.5 Determinación de conductividad eléctrica

Se tomaron entre 10 a 15 gramos de muestra de suelo y se añadió agua destilada (aproximadamente 30

mL). Las muestras se agitaron durante 5 minutos con una varilla de vidrio y se dejaron reposar durante 30 minutos. Posterior a ello, se volvieron a agitar antes de la lectura. Las muestras se dejaron en reposo durante 24 horas y finalmente, se midió la conductividad eléctrica de forma directa con el uso del sensor de conductividad Thermo Scientific™ Orion™.

2.6.6 Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía

Se realizó el ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de distintos grupos. Para ello, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.0.2 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EE. UU., www.graphpad.com.

2.6.7 Elaboración de mapas de diagrama de superficie

Para este paso, se utilizó el software Surfer 28.1 (Golden Surfer, LLC) para la creación y análisis de diagramas de superficie de acuerdo con cada punto muestreado y para cada parámetro evaluado donde se pueden identificar las distancias entre cada punto georeferenciado.

2.6.8 Análisis de correlación

Se realizó un análisis de correlación de Spearman, que corresponde al análisis no paramétrico para evaluar la asociación entre las variables (pH, humedad del suelo, contenido de materia orgánica, pH, granulometría y conductividad eléctrica) y la presencia de muestras positivas a *Coccidioides* en cada uno de los sitios de estudio. Este enfoque es adecuado para analizar relaciones no lineales y datos que no cumplen con los supuestos de la correlación de Pearson como la normalidad o linealidad o cuando las variables se miden en escalas ordinales (Hauke y Kossowski, 2011).

El análisis se llevó a cabo utilizando el software R Studio 2024.04.2 (Posite Software, PBC) y permitió identificar posibles patrones de dependencia entre las variables. Los coeficientes de correlación de Spearman varían en un rango de -1 a 1, donde valores positivos ($r_s > 0$) indican una relación directa entre las variables (a medida que una aumenta, la otra también), mientras que valores negativos ($r_s < 0$) reflejan

una relación inversa (a medida que una variable aumenta, la otra disminuye). Un valor cercano a 0 sugiere una ausencia de asociación entre las variables analizadas (Rebekić et al., 2015).

Este enfoque permitió la asociación entre variables ambientales y la presencia de *Coccidioides*

En este estudio, se determinó que existe una correlación entre las variables a partir de valores iguales o mayores de 0.5. Por debajo de este rango, se consideró una correlación negativa entre las variables.

2.7 Elaboración de mapas de prevalencia ambiental

Con los datos obtenidos de la toma de las muestras, se elaboraron mapas de prevalencia ambiental indicando la distribución de todos los sitios muestreados tanto positivos como negativos. Se realizó una comparativa de las muestras positivas entre la técnica de PCR anidada y la ddPCR, así como de los sitios georreferenciados que resultaron positivos para la presencia de *Coccidioides* spp. en estudios anteriores.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Sitios de muestreo

Para la toma de las muestras, se seleccionaron dos sitios que habían sido previamente identificados como positivos para la presencia de *Coccidioides* spp. (Cairns et al., 2000; Baptista-Rosas et al., 2012). Estos sitios fueron el albergue en construcción abandonado en Rancho Gilbert en VDP (Figura 5) y la localidad de la Comunidad de San José de la Zorra (Figura 7), con un total de 20 y 26 puntos muestreados, respectivamente. Para los otros sitios nuevos, la selección se basó en su cercanía con el sitio de VDP; estos fueron el Rancho Carrizo, con un total de 18 muestras (Figura 6A) y Rancho las Golondrinas, con 12 muestras (Figura 6B).

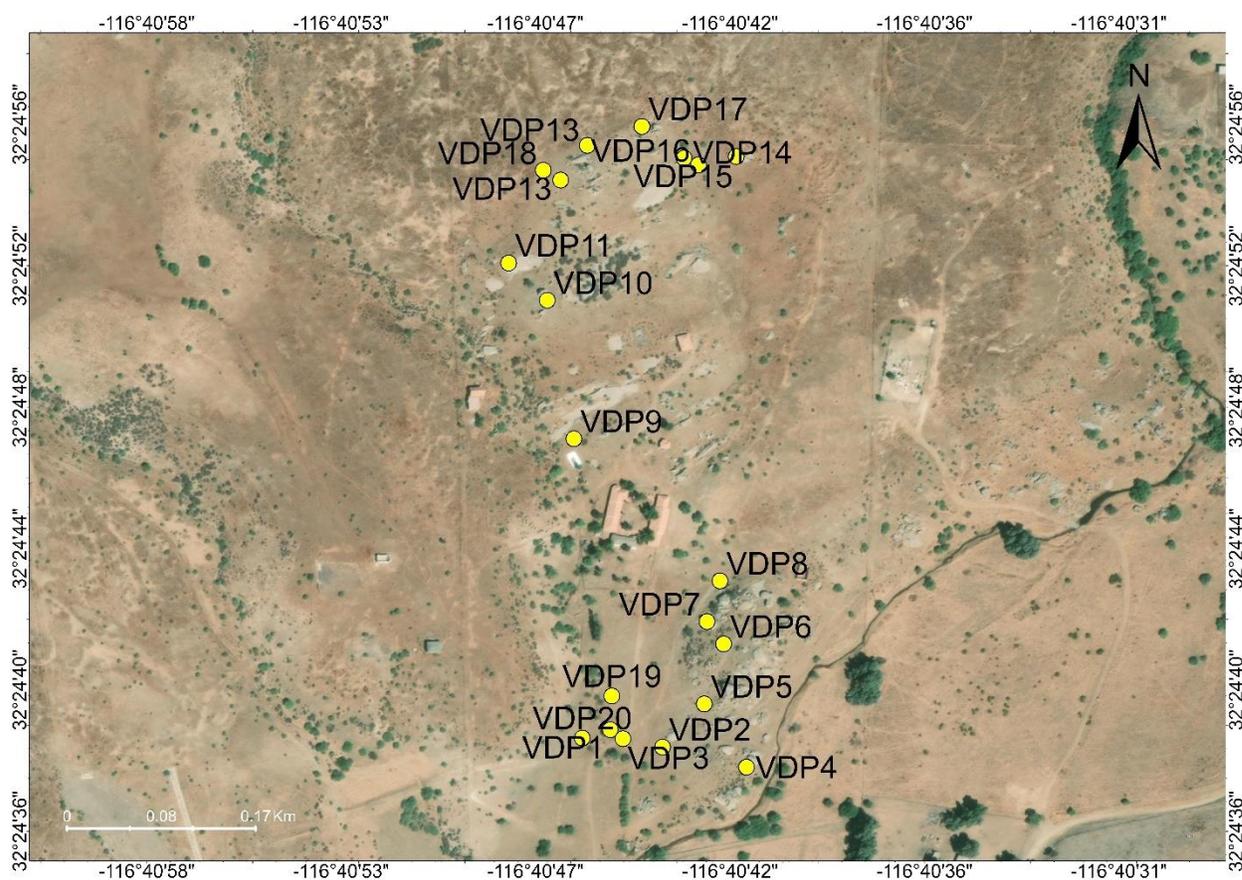


Figura 5. Puntos de muestreo del sitio 1 en Valle de las Palmas, Baja California.

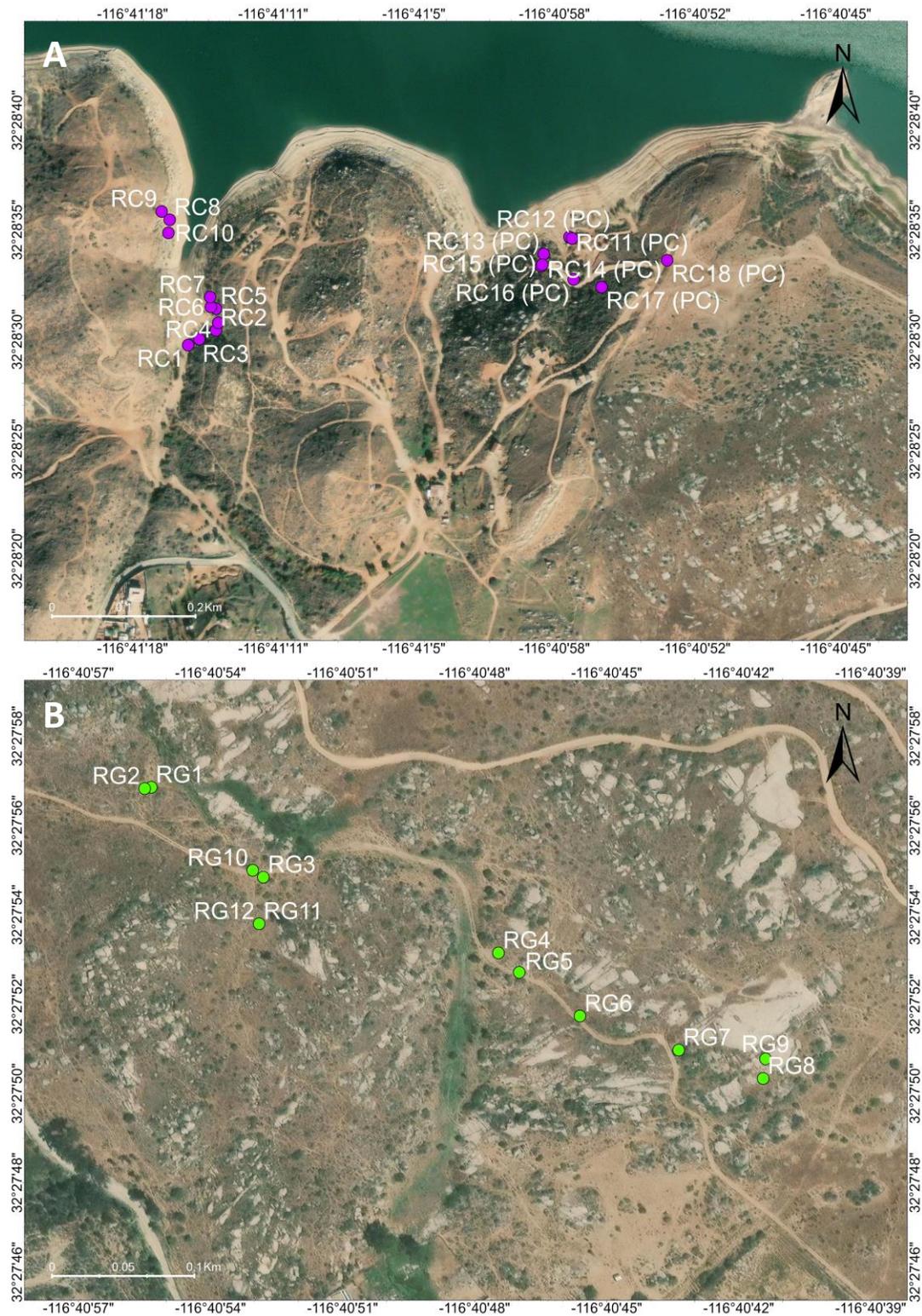


Figura 6. Puntos de muestreo de los sitios 2 y 3. A) Rancho el Carrizo, Baja California. B) Rancho las Golondrinas, Baja California.



Figura 7. Puntos de muestreo del sitio 4 en la comunidad de San José de la Zorra, Baja California.

3.2 Toma de muestras

Para cada uno de los sitios, se obtuvieron los siguientes parámetros: temperatura, velocidad del viento, tipo de vegetación principal, textura del suelo, compactación del suelo, condición de humedad observable y lugar de obtención de la muestra (Anexo A-D).

El promedio de las temperaturas de todos los sitios fue de 25.71°C, y el promedio de la velocidad del viento de 2.58 m/s. La mayoría de las muestras tomadas estaban asociadas a un tipo de vegetación principal de tipo chaparral y fueron tomadas de suelos no compactados.

Las muestras se tomaron de sitios con una condición de humedad seca y en madrigueras sin cobertura o asociación.

3.3 Extracción de ADN ambiental de las muestras tomadas del suelo

Se observó la integridad del ADN extraído de las muestras de cada uno de los sitios (Figura 8-11) y se midió la concentración (ng/μL), así como la pureza A260/280.

Para el caso de las 20 muestras de VDP, las concentraciones de las muestras fueron variables, siendo la de mayor concentración la muestra 8 con 63.7 ng/μL y la de menor concentración la muestra 12 con 8.9 ng/μL (Tabla 3).

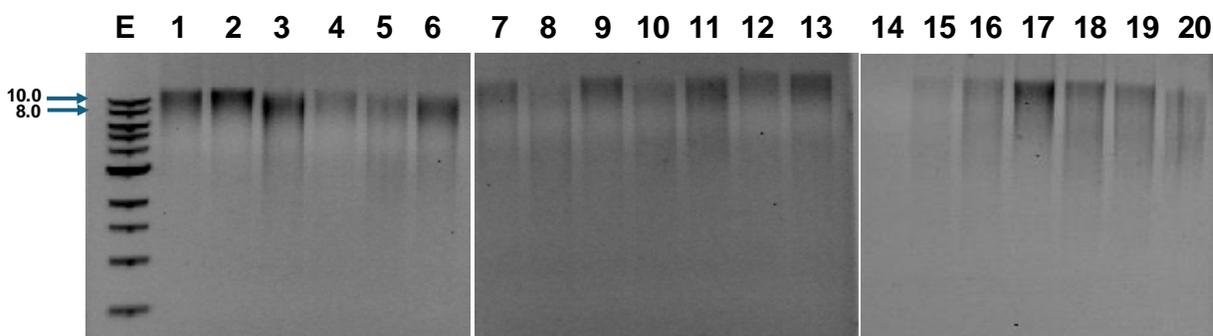


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 20.

Tabla 3. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 1 (Valle de las Palmas).

Muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza 260/280
VDP1	24.40	1.58
VDP2	16.60	1.66
VDP3	34.20	1.72
VDP4	16.70	1.37
VDP5	10.10	1.55

VDP6	16.60	1.6
VDP7	23.10	1.67
VDP8	63.70	1.37
VDP9	24.60	1.45
VDP10	21.30	1.38
VDP11	18.30	1.61
VDP12	8.90	1.48
VDP13	14.90	1.47
VDP14	10.90	1.55
VDP15	10.80	1.55
VDP16	16.30	1.65
VDP17	58.90	1.79
VDP18	21.70	1.71
VDP19	35.80	1.71
VDP20	33.80	1.64

Para las 18 muestras de RC, la de mayor concentración fue la muestra 14, con 129.2 ng/ μ L y las de menor concentración fueron de las muestras 5 y 11 con 4.0 ng/ μ L (Tabla 4).

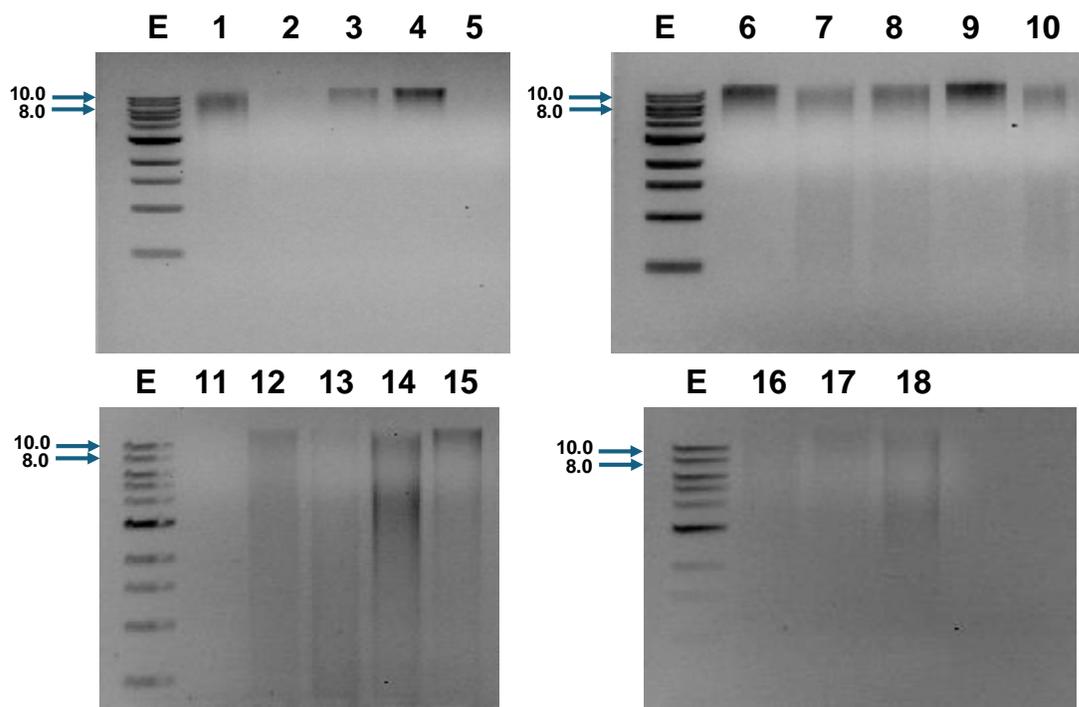


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de Rancho el Carrizo. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 18.

Tabla 4. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 2 (Rancho el Carrizo).

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Pureza 260/280
RC1	17.50	1.82
RC2	6.60	1.66
RC3	10.50	1.65
RC4	20.00	1.53
RC5	4.00	1.64
RC6	9.20	1.92
RC7	10.80	1.87
RC8	12.80	1.90
RC9	26.30	1.83
RC10	6.90	1.81
RC11	4.00	1.75
RC12	17.90	1.70
RC13	11.20	1.57
RC14	129.20	1.67
RC15	43.20	1.62
RC16	8.90	1.71
RC17	6.60	1.70
RC18	37.50	1.75

En cuanto a las 12 muestras de RG, la de mayor concentración fue la muestra 2, con 132.2 ng/ μ L y la de menor concentración fue la muestra 5 con 8.2 ng/ μ L (Tabla 5).

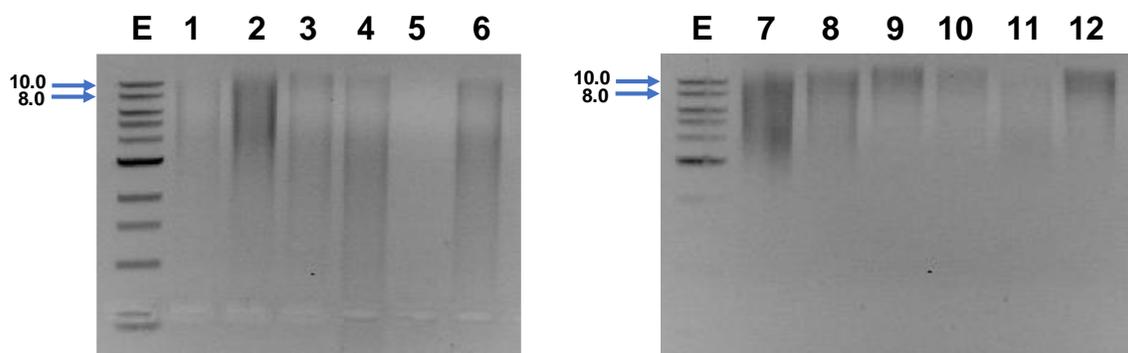


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de Rancho las Golondrinas. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 12.

Tabla 5. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 3 (Rancho las Golondrinas).

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	Pureza 260/280
RG1	13.20	1.82
RG2	132.20	1.64
RG3	29.00	1.71
RG4	27.60	1.89
RG5	8.20	1.75
RG6	56.70	1.75
RG7	75.90	1.78
RG8	41.90	1.86
RG9	46.70	1.81
RG10	21.30	1.70
RG11	31.40	1.77
RG12	49.70	1.81

Para las muestras de SJZ, la de mayor concentración fue la muestra 15, con 104.4 ng/ μ L y la de menor concentración fue la muestra 10 con 1.2 ng/ μ L (Tabla 6).

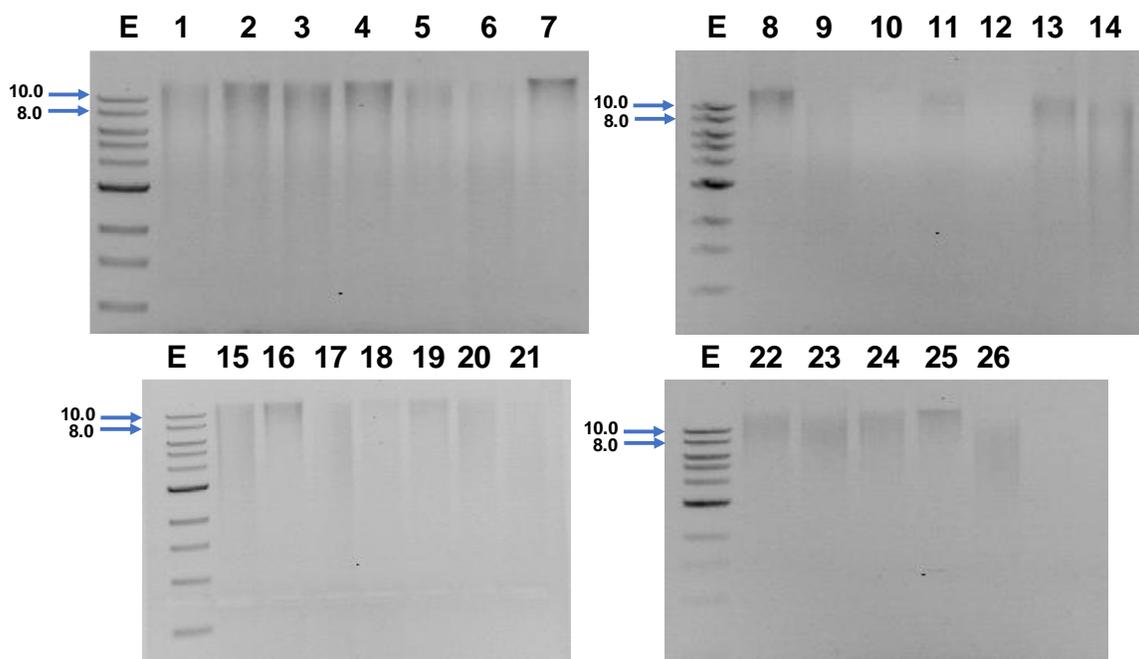


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados del estado del ADN ambiental de las muestras de la comunidad de San José de la Zorra. E: Escalera NEB™ (1 kb); muestras 1 a 26.

Tabla 6. Concentración y pureza del ADN de las muestras de suelo del sitio 4 (Comunidad de San José de la Zorra).

Muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza 260/280
SJZ1	40.80	1.41
SJZ2	33.10	1.67
SJZ3	38.60	1.68
SJZ4	35.90	1.59
SJZ5	30.50	1.58
SJZ6	9.00	1.76
SJZ7	30.60	1.67
SJZ8	34.00	1.67
SJZ9	14.40	1.84
SJZ10	1.20	1.63
SJZ11	11.80	1.82
SJZ12	2.20	1.78
SJZ13	17.10	1.71
SJZ14	57.80	1.84
SJZ15	104.40	1.78
SJZ16	41.10	1.77
SJZ17	90.80	1.82
SJZ18	14.50	1.76
SJZ19	22.00	1.73
SJZ20	29.80	1.85
SJZ21	8.40	1.65
SJZ22	24.20	1.62
SJZ23	27.70	1.68
SJZ24	23.50	1.82
SJZ25	17.20	1.74
SJZ26	28.60	1.67

3.4 Diagnóstico de *Coccidioides* spp. por PCR anidada

Del total de las 76 muestras analizadas de todos los sitios, una vez llevada a cabo la segunda amplificación de la PCR, solamente 5 muestras del sitio 1 (VDP) resultaron positivas para *Coccidioides* spp. (6.5 % de todas las muestras), con bandas por debajo de 200 pb y arriba de 100 pb (el producto esperado es de

alrededor de 120 pb). Dichas muestras fueron las obtenidas de los puntos VDP1, VDP9, VDP10, VDP19 y VDP20 (Figura 12).

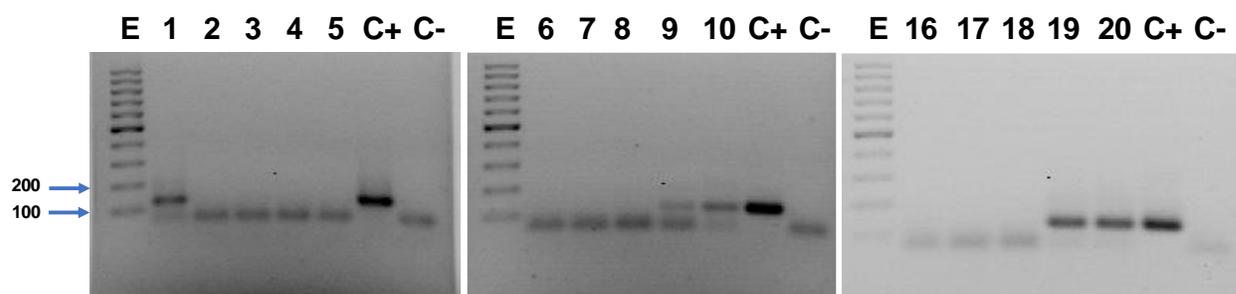


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio. Resultados de la amplificación de la región ITS1 de las muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras, C+: control positivo (ADN de *C. posadasii*), C-: control negativo (agua HPLC).

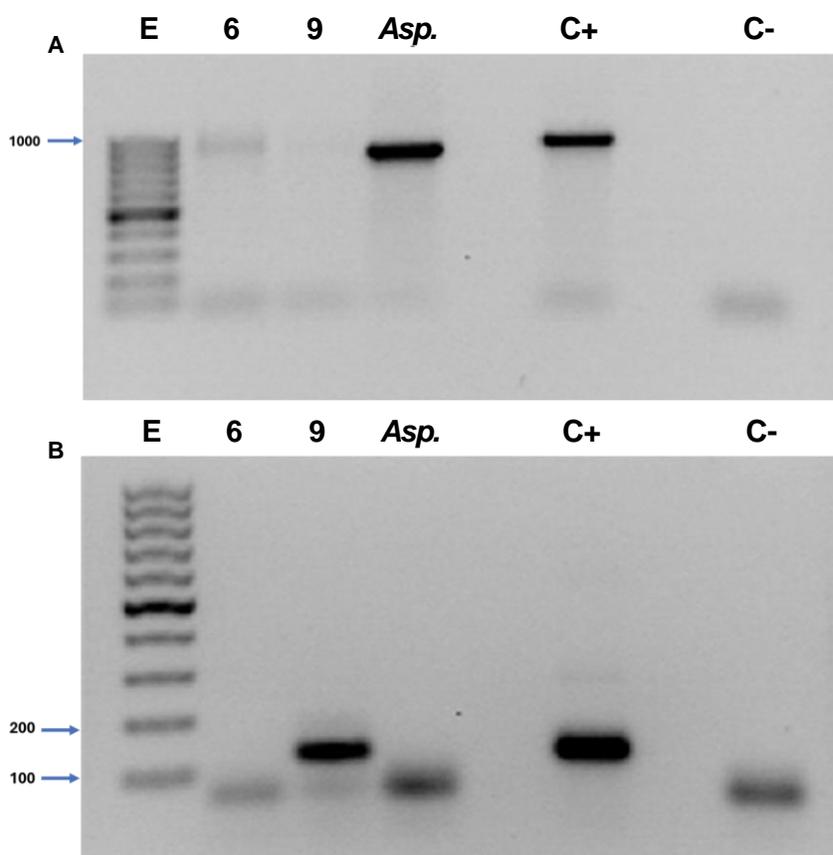


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1 y 2%) teñido con bromuro de etidio. A) Resultados de la amplificación de la región ITS de dos muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras, Asp: *A. fischeri*, C+: control positivo (*C. posadasii*), C-: control negativo (agua HPLC). B) Resultados de la amplificación de la región ITS1 de dos muestras de Valle de las Palmas. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras, Asp: *A. fischeri*, C+: control positivo (*C. posadasii*), C-: control negativo (agua HPLC).

Para corroborar que los oligonucleótidos que se utilizaron para la detección de las especies de *Coccidioides* fueran específicos, se utilizó ADN del hongo *A. fischeri* realizando ambos ciclos de PCR. En la primera reacción, se observan amplicones para la muestra de *A. fischeri* y el control positivo (*C. posadasii*), indicando que sí existe la presencia de algún hongo. En la segunda reacción, se pudo observar la amplificación de la muestra 9, lo que confirma con los resultados anteriormente presentados que dicha muestra era positiva. Los oligonucleótidos no amplificaron para el ADN de *A. fischeri*, pero sí para la muestra control positiva, lo que indica que dichos oligonucleótidos son específicos para *Coccidioides* (Figura 13).

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación correspondiente a los 5 amplicones y de su respectivo análisis BLAST, se confirmó que las 5 muestras analizadas resultaron ser *C. immitis* (Tabla 7). A su vez, el control positivo que se utilizó durante todos los experimentos también fue llevado a secuenciar y los resultados obtenidos confirmaron ser la especie *C. posadasii*.

Tabla 7. Especies de hongos identificados por secuenciación de los amplicones de la región ITS1 posterior a la extracción de ADN ambiental en cinco muestras de suelo.

Muestra	Especies de hongos de los amplicones por extracción de ADN de suelo (región ITS1)	Valor de E	% Identidad
VDP1	<i>Coccidioides immitis</i>	3e-38	98.10%
VDP9	<i>Coccidioides immitis</i>	1e-33	98.88%
VDP10	<i>Coccidioides immitis</i>	2e-36	100%
VDP19	<i>Coccidioides immitis</i>	2e-35	98.91%
VDP20	<i>Coccidioides immitis</i>	3e-31	97.59%
Control + (<i>C. posadasii</i>)	<i>Coccidioides posadasii</i>	6e-40	98.06%

3.5 Diagnóstico de *Coccidioides* spp. por ddPCR

Previo a la detección de las muestras de *Coccidioides* por ddPCR, se procedió a realizar una prueba de PCR anidada iniciando el primer ciclo de amplificación con oligonucleótidos NS1 y NLB4, seguido del segundo ciclo de amplificación con los oligonucleótidos modificados de la PCR anidada para corroborar que dichos oligonucleótidos fueran viables. Los resultados mostraron que los oligonucleótidos ITS1CF (EVA) e ITS1CR (EVA) son específicos para *Coccidioides* spp., ya que lograron amplificar las muestras que anteriormente

habían resultado positivas con los oligonucleótidos ITS1CF e ITS1CR (1, 9, 10, 19 y 20) dando el producto esperado de 120 pb. (Figura 14).

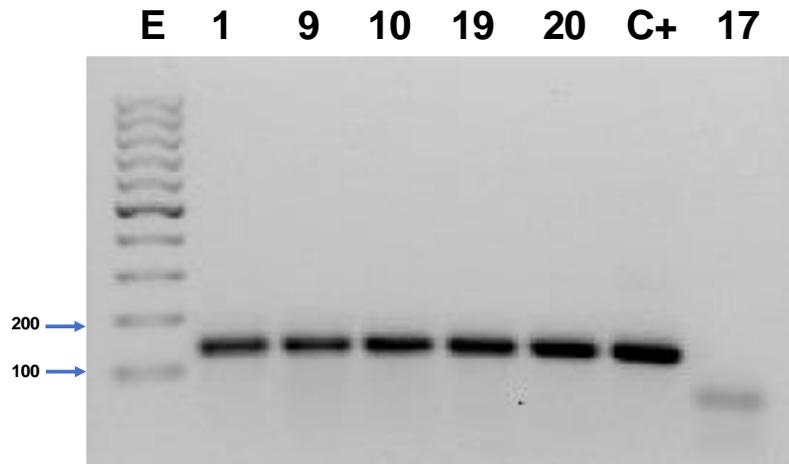


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) teñido con bromuro de etidio. Resultados de la amplificación de la región ITS1 con oligonucleótidos para ddPCR. E: Escalera GeneRuler™ (100 pb), muestras 1, 9, 10, 19 y 20. C+: control positivo (*C. posadasii*), muestra 17 como control negativo.

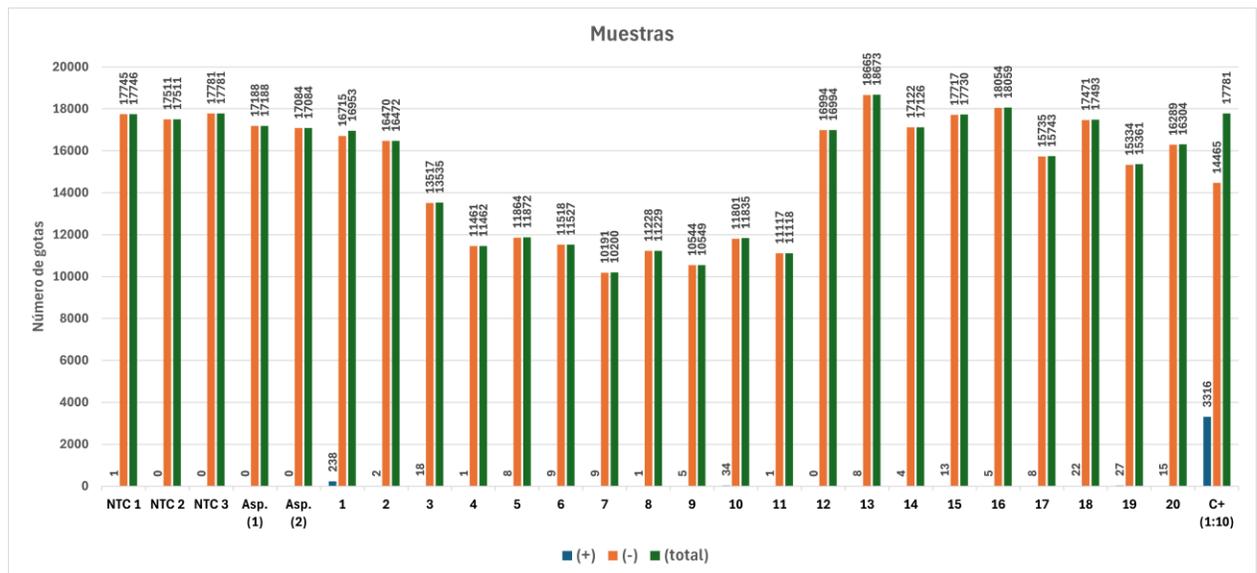


Figura 15. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de Valle de las Palmas. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).

Para llevar a cabo la ddPCR, se inició con las 20 muestras de VDP. Se generaron más de 10,000 gotas para todas las muestras, un número adecuado para tener resultados confiables. Dos de tres NTC (controles negativos) no presentaron ninguna gota positiva, lo que indica que no hubo detección de la presencia de *Coccidioides*, al igual que los otros dos controles negativos pertenecientes al ADN de *A. fisheri*. Sin embargo, el primer control negativo (NTC 1) presentó la amplificación de una gota (Figura 15), con un

límite de detección de 0.0663 copias/ μ L (Anexo E) por lo que este resultado pudo deberse a contaminación durante la manipulación del experimento, dado esto, se decidió que este sería el límite de detección.

De las 20 muestras de VDP, 16 mostraron la amplificación de gotas positivas, lo que indica la presencia de *Coccidioides* (número de gotas azules). Los resultados demostraron que las muestras que fueron positivas para la PCR anidada (1, 9, 10, 19 y 20) también lo fueron para la ddPCR. Aunado a ello, el resto de las muestras analizadas a excepción de las muestras 4, 8, 11 y 12, resultaron positivas a *Coccidioides*, dando un total de 80 % de muestras positivas (Figura 16).

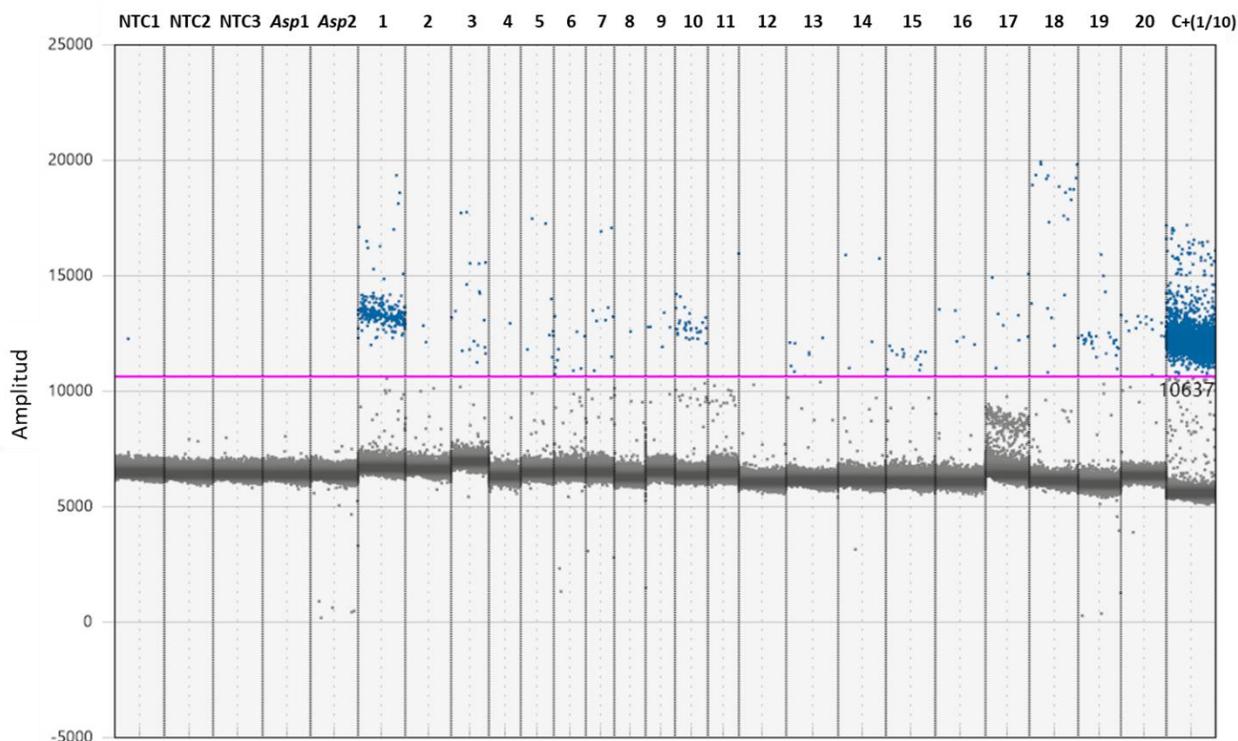


Figura 16. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de Valle de las Palmas por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/ μ L).

En cuanto a las 18 muestras de RC que habían resultado negativas por PCR anidada, 5 muestras (RC1, RC5, RC8, RC10 y RC18) presentaron amplificación de gotas positivas por ddPCR (27.7 % del total) (Figura 17 y 18).

Por otro lado, del total de las 12 muestras de RG que habían dado en su totalidad negativas por PCR anidada, solamente una muestra (RG4) resultó ser positiva con la técnica ddPCR (8.3 %) (Figura 19 y 20).

Por último, para SJZ, de las 26 muestras que habían resultado negativas por PCR anidada, 8 muestras (SJZ3, SJZ4, SJZ6, SJZ8, SJZ14, SJZ20, SJZ22 y SJZ24) resultaron positivas con ddPCR (30.7 %) (Figuras 21 y 22).

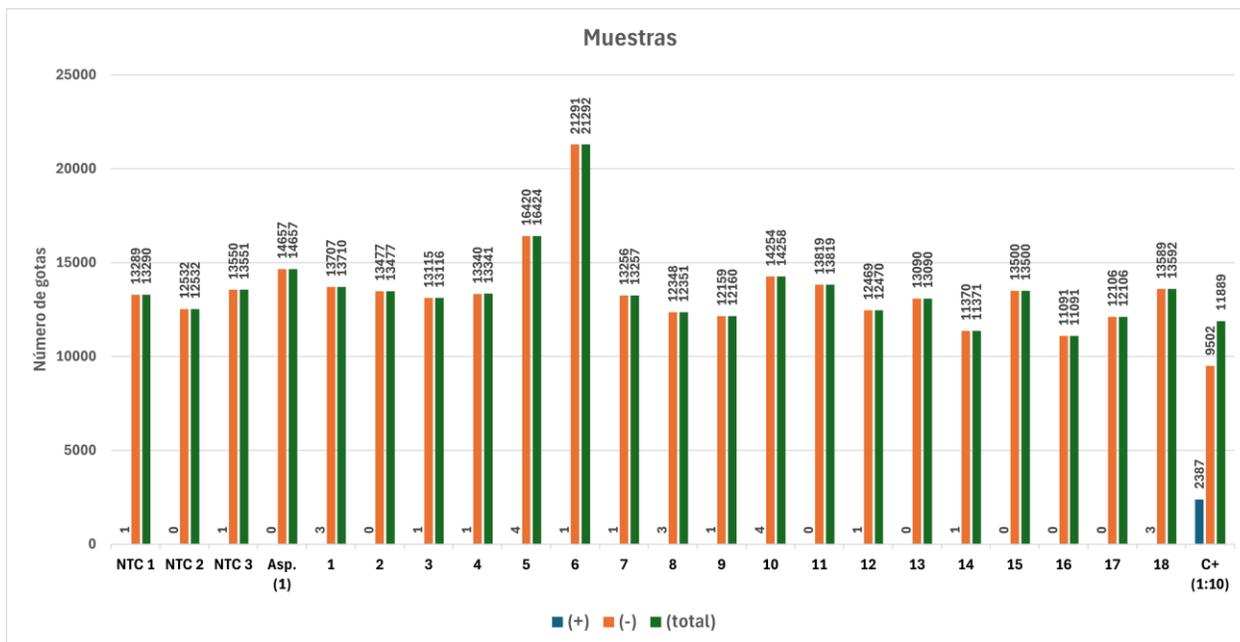


Figura 17. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de Rancho el Carrizo. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).

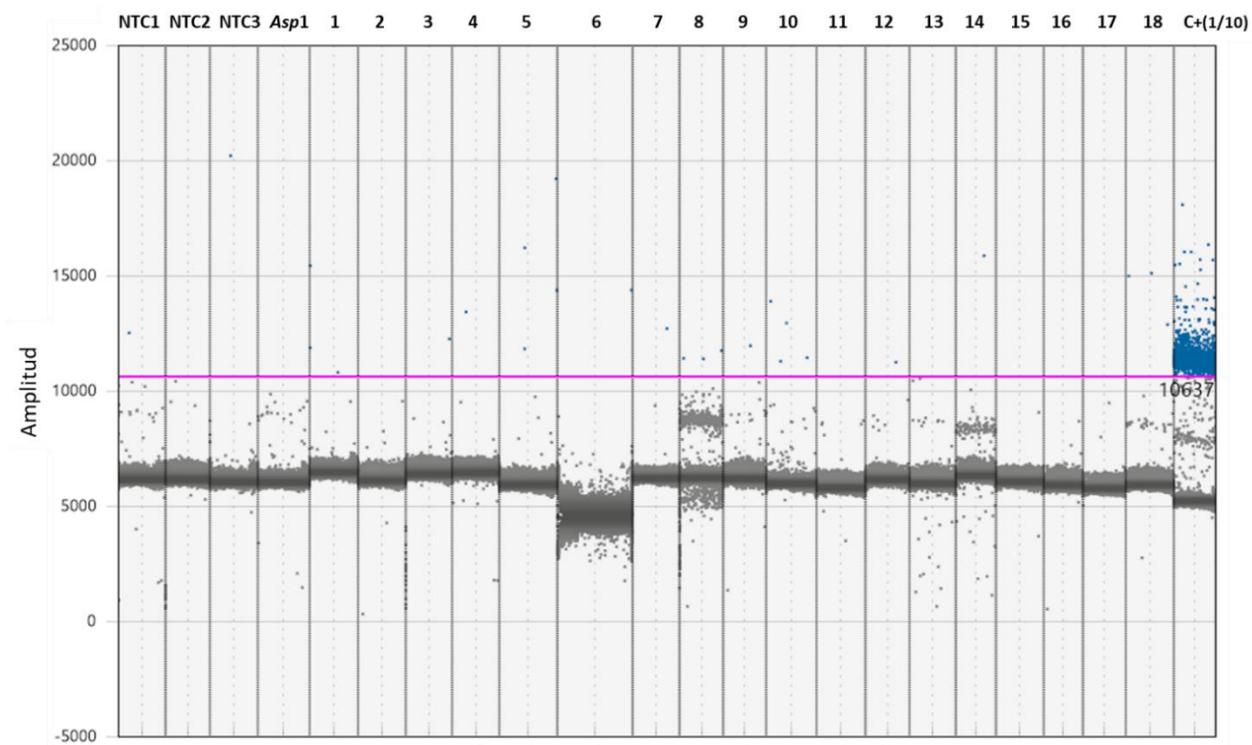


Figura 18. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de Rancho el Carrizo por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/μL).

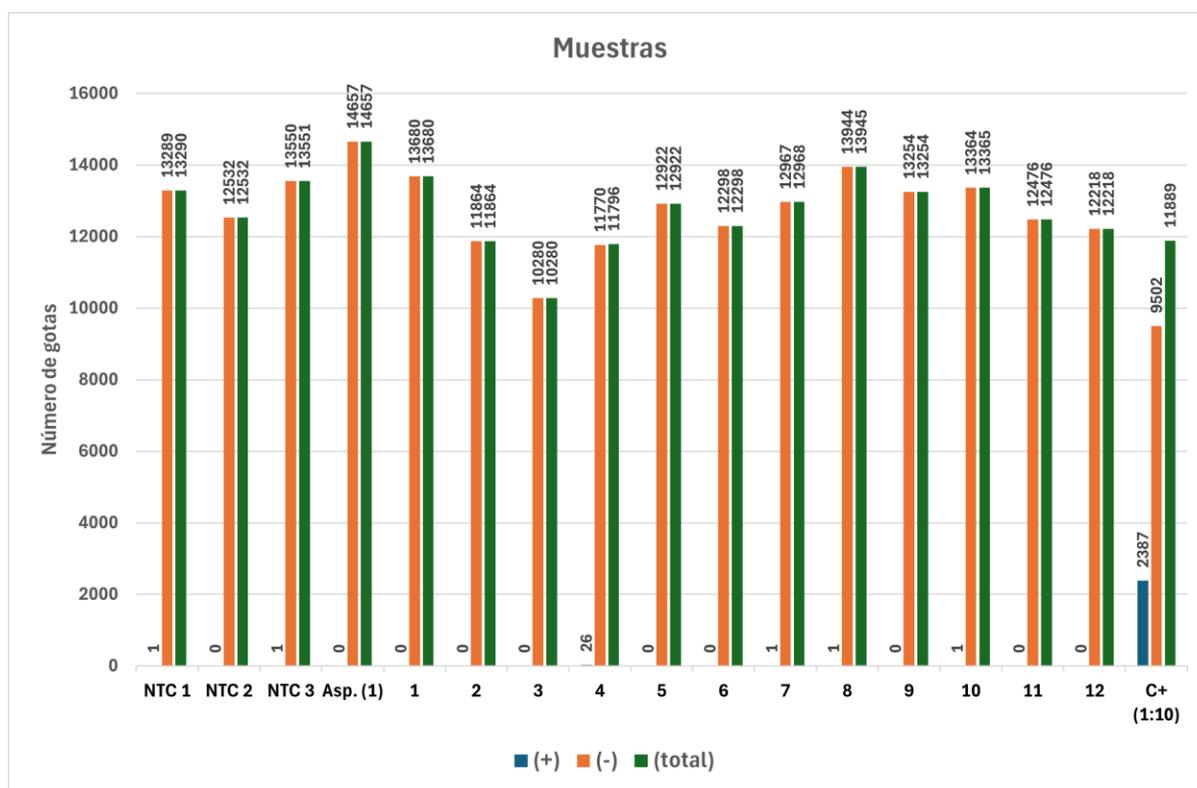


Figura 19. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de Rancho las Golondrinas. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).

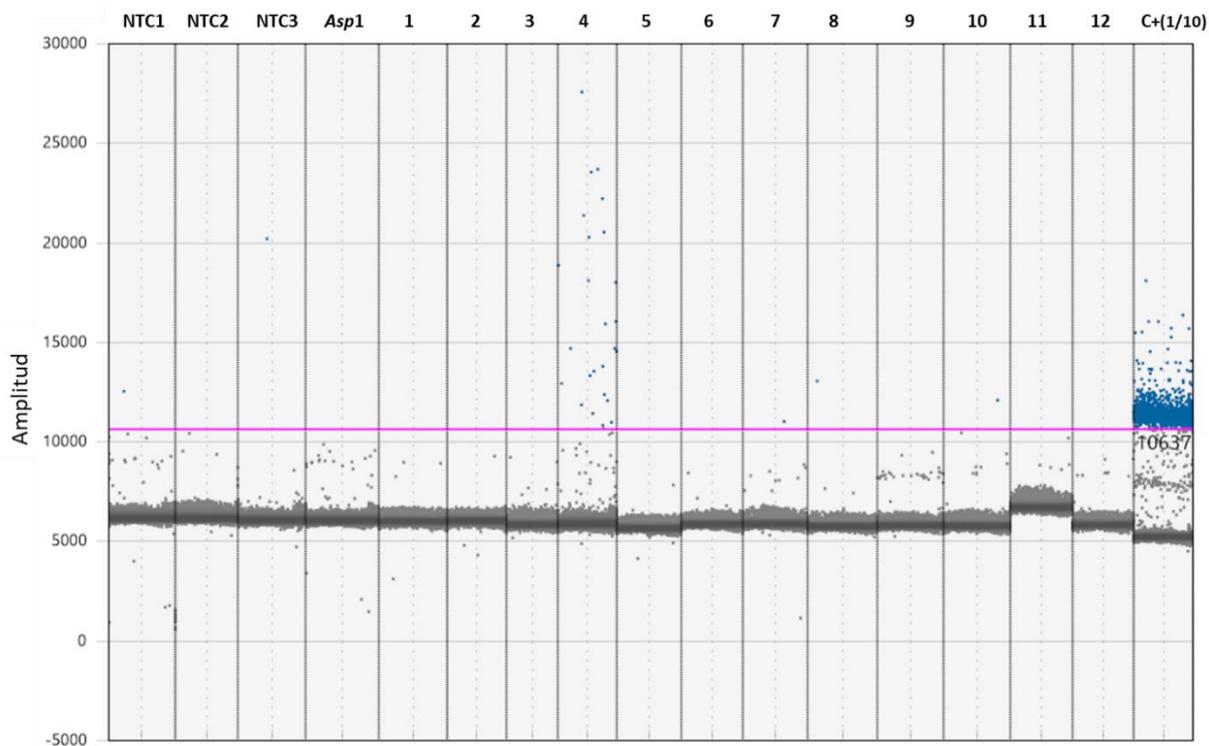


Figura 20. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de Rancho las Golondrinas por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/ μ L).

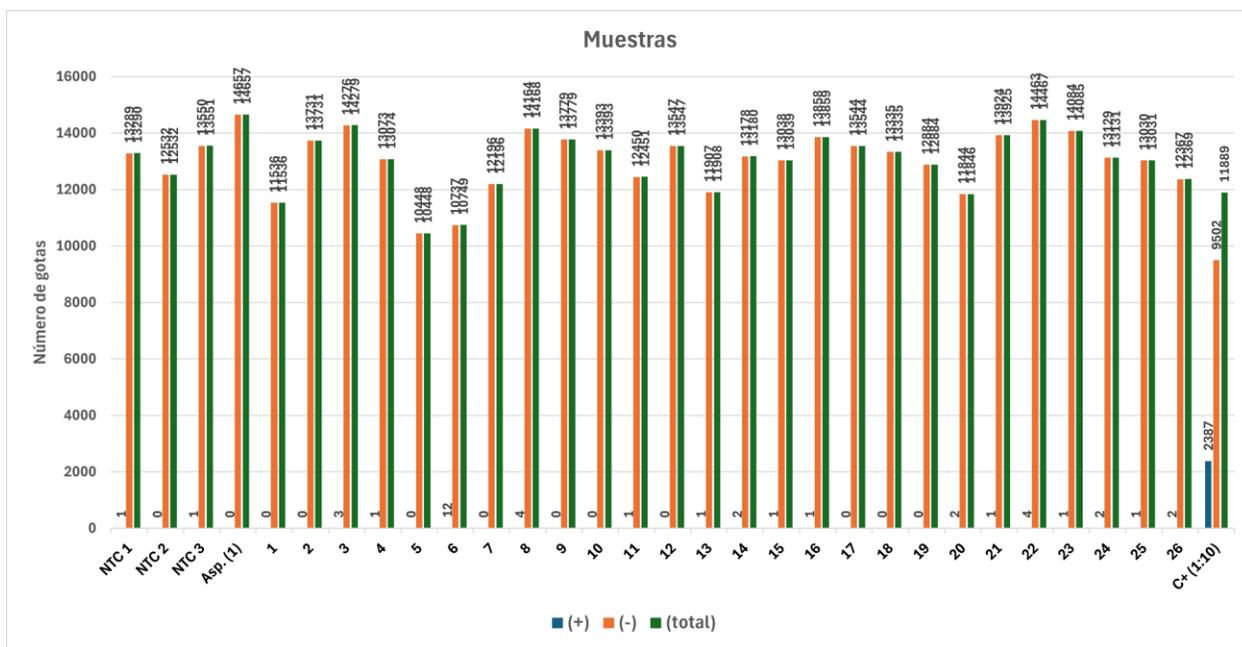


Figura 21. Análisis numérico de gotas de muestras de suelo de la comunidad de San José de la Zorra. Barras azules gotas positivas; naranja gotas negativas; verde número total de gotas (positivas y negativas).

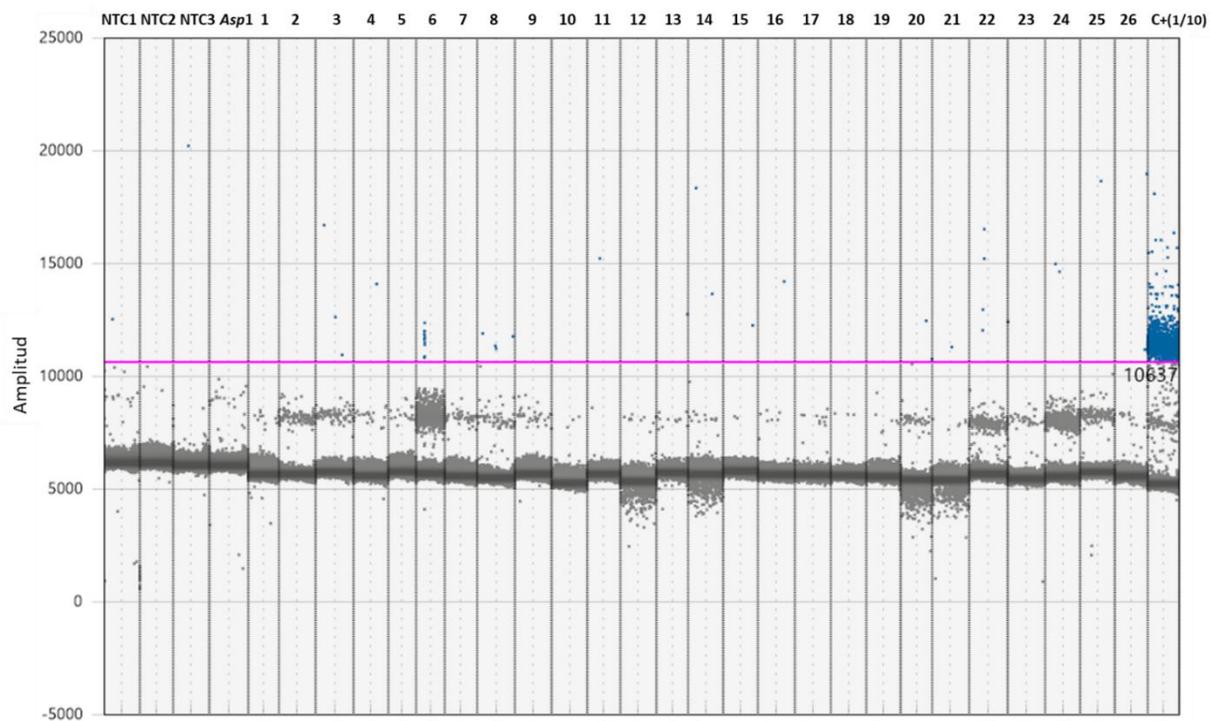


Figura 22. Diagrama de distribución de gotas de muestras de suelo de la comunidad de San José de la Zorra por ddPCR. Puntos azules corresponden a gotas positivas; puntos grises corresponden a gotas negativas. C+ (4.8 ng/μL).

3.6 Procesamiento de muestras de suelo

3.6.1 Contenido de humedad

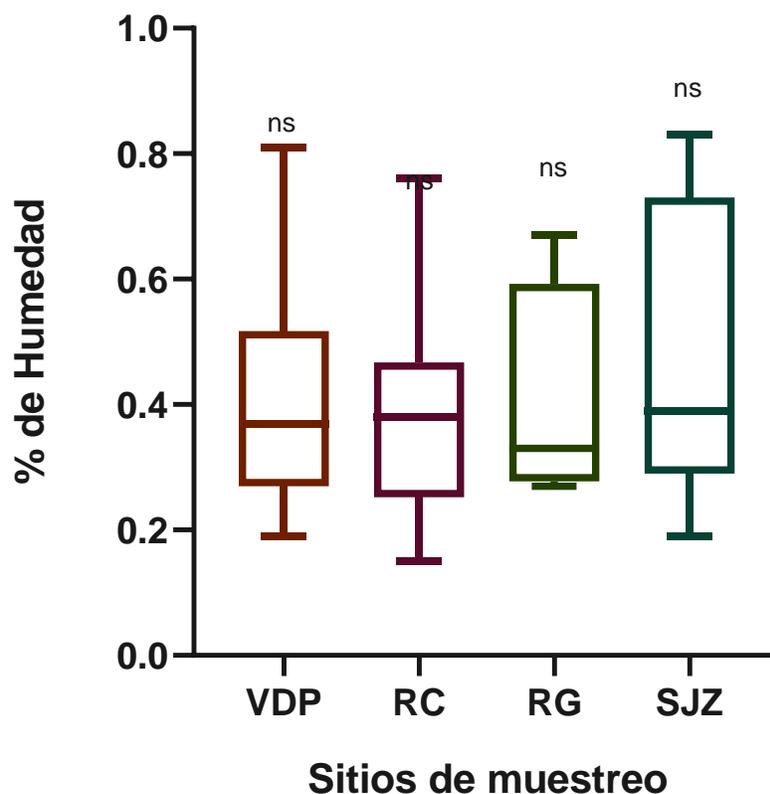


Figura 23. Porcentaje de humedad en muestras de suelo de los sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P > 0.05$).

En cuanto al contenido de humedad, las muestras de todos los sitios (VDP, RC, RG y SJZ) presentaron un porcentaje promedio menor al 1 % (0.43, 0.38, 0.4 y 0.45, respectivamente). A pesar de ello, no existieron diferencias significativas entre cada uno de los sitios, ya que los valores obtenidos con la prueba de ANOVA fueron de $P > 0.05$ (Figuras 23 y 24).

Los valores más altos de humedad se presentaron en SJZ (0.83 %) y el valor mínimo de 0.15 % en RC.

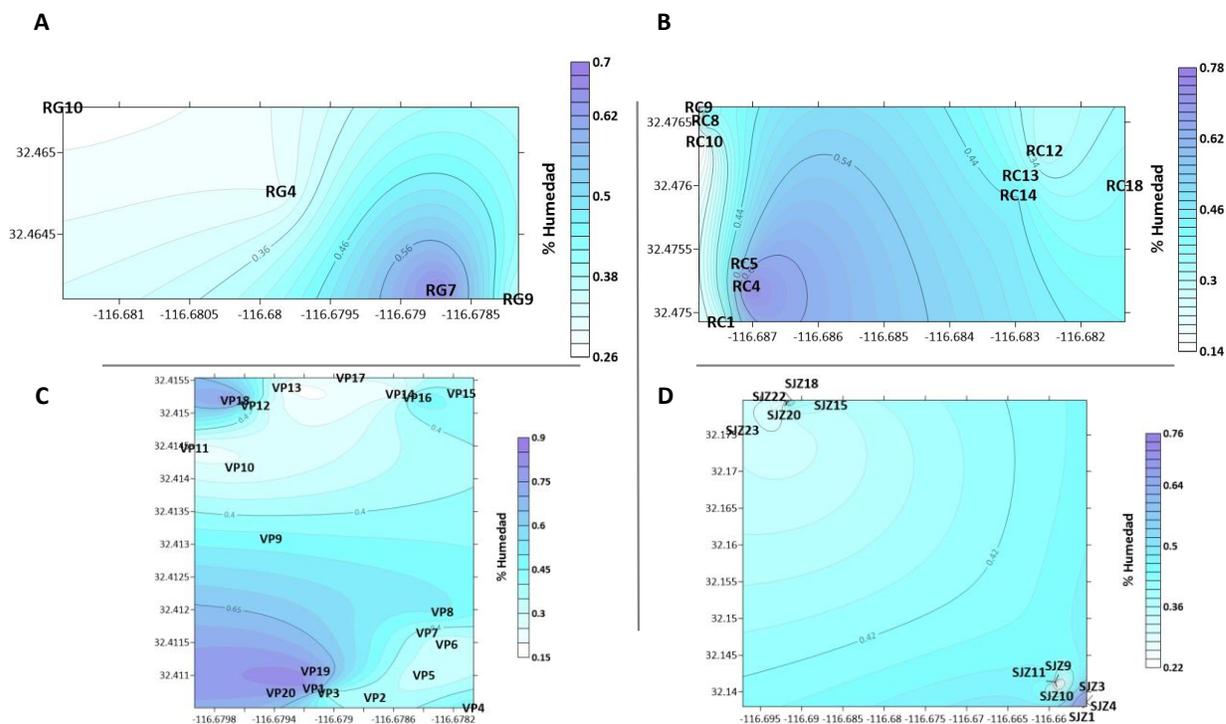


Figura 24. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes a la humedad. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras.

3.6.2 Contenido de materia orgánica

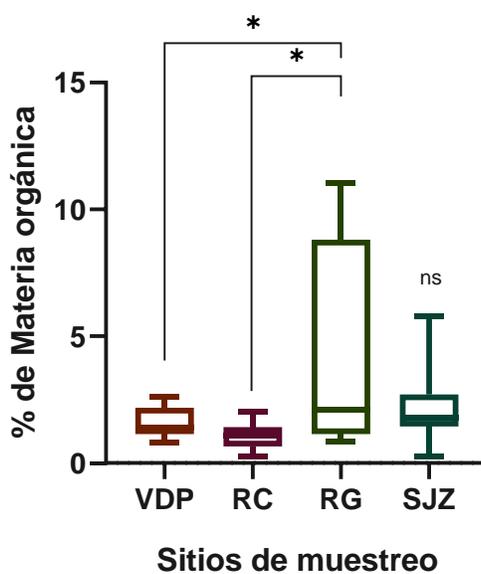


Figura 25. Porcentaje de materia orgánica en muestras de suelo de los Sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P>0.05$), el asterisco (*) indica diferencia significativa entre muestras ($P<0.05$).

En relación con el contenido de materia orgánica, en general todos los sitios presentaron un contenido menor al 5 % con valores de 1.65 % para VDP, 1.08 % para RC, 4.02 % para RG y 2.41 % para SJZ con diferencias significativas entre VDP y RG, así como RC y RG (Figura 25 y 26).

El valor máximo de contenido de materia orgánica fue de 11.03 % para RG y un mínimo de 0.26 % en SJZ.

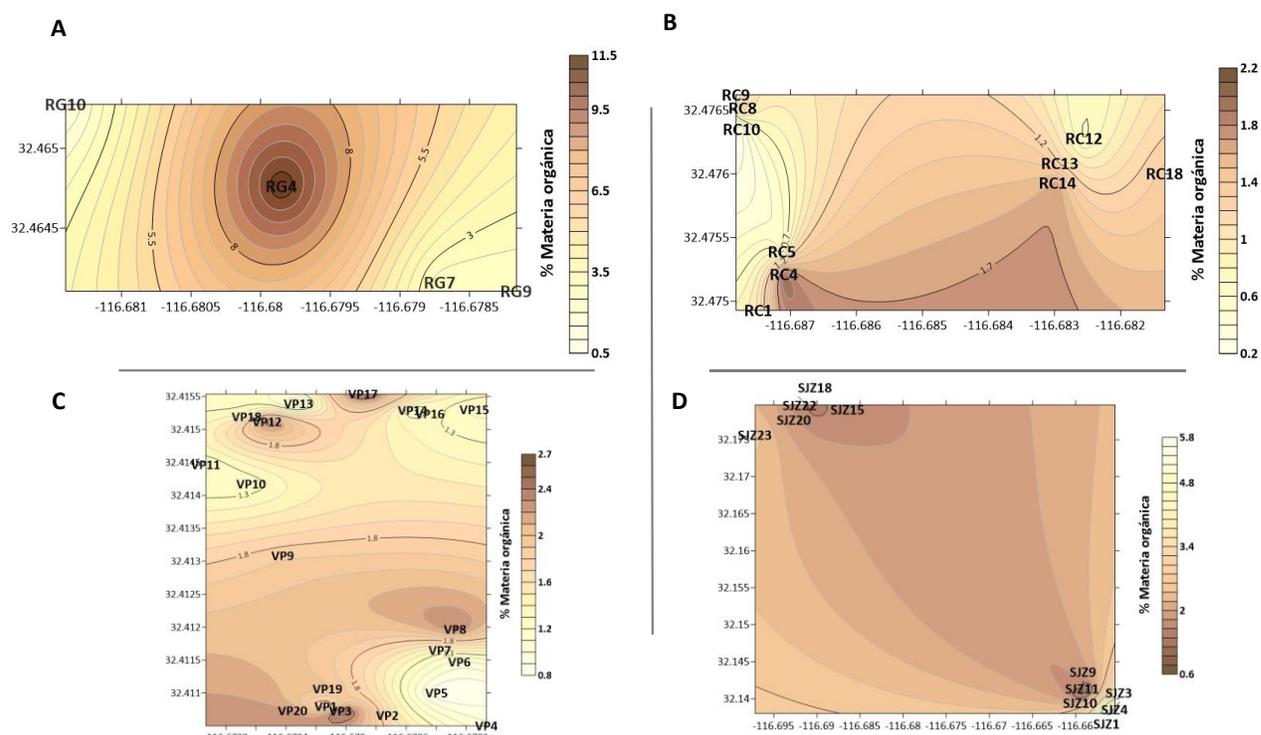


Figura 26. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes a la materia orgánica. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras.

3.6.3 Textura del suelo

De acuerdo con los cálculos obtenidos en relación con el tamaño de las partículas de suelo y el triángulo de las texturas, los porcentajes de arcilla, limo y arena se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentajes de arcilla, limo y arena y su clasificación para las muestras de Valle de las Palmas. El color rojo indica las muestras positivas por ddPCR.

Muestra	% Arcilla	% Limo	% Arena	Clasificación
VDP1	11.86	15.14	73.00	Franco arenoso
VDP2	8.41	8.56	83.03	Arenoso franco
VDP3	4.76	5.17	90.07	Arenosa

VDP4	8.72	12.11	79.17	Arenoso franco
VDP5	17.60	11.63	70.77	Franco arenoso
VDP6	15.63	11.84	72.54	Franco arenoso
VDP7	41.13	14.69	44.17	Arcillosa
VDP8	8.28	6.21	85.51	Arenoso franco
VDP9	4.81	5.34	89.85	Arena
VDP10	9.42	11.67	78.92	Arenoso franco
VDP11	11.83	8.45	79.72	Franco arenoso
VDP12	5.86	4.18	89.96	Arena
VDP13	9.05	9.87	81.08	Arenoso franco
VDP14	7.31	11.07	81.62	Arenoso franco
VDP15	11.45	10.80	77.75	Franco arenoso
VDP16	9.67	8.39	81.93	Arenoso franco
VDP17	3.16	2.87	93.96	Arena
VDP18	9.17	10.66	80.16	Arenoso franco
VDP19	7.76	13.55	78.69	Arenoso franco
VDP20	7.10	15.78	77.11	Arenoso franco
RC1	4.90	19.62	75.48	Arenoso franco
RC4	3.64	7.27	89.09	Arena
RC5	12.53	16.71	70.75	Franco arenoso
RC8	7.32	15.83	76.85	Arenoso franco
RC9	8.84	9.82	81.34	Arenoso franco
RC10	24.43	48.87	26.70	Franco
RC12	12.30	15.38	72.31	Franco arenoso
RC13	8.38	10.47	81.15	Arenoso franco
RC14	5.22	7.83	86.95	Arenoso franco
RC18	6.91	7.48	85.61	Arenoso franco
RG4	1.43	1.27	97.30	Arena
RG7	3.82	6.19	89.99	Arena
RG9	4.47	8.46	87.06	Arena
RG10	11.07	8.97	79.96	Franco arenoso
SJZ1	2.44	7.27	90.30	Arena
SJZ3	3.00	5.14	91.86	Arena
SJZ4	7.10	11.16	81.74	Arenoso franco
SJZ9	8.33	12.49	79.18	Arenoso franco
SJZ10	29.28	39.05	31.67	Franco arcilloso

SJZ11	14.88	19.84	65.27	Franco arenoso
SJZ15	5.26	11.38	83.35	Arenoso franco
SJZ18	10.23	20.47	69.30	Franco arenoso
SJZ20	6.42	7.33	86.25	Arenoso franco
SJZ22	8.71	13.07	78.22	Arenoso franco
SJZ23	4.00	9.01	86.99	Arenoso franco

La mayoría de los sitios muestreados presentaron suelos de tipo arenoso franco con un 48.89 %, seguido del tipo franco arenoso con un 22.22 % (Figura 27).

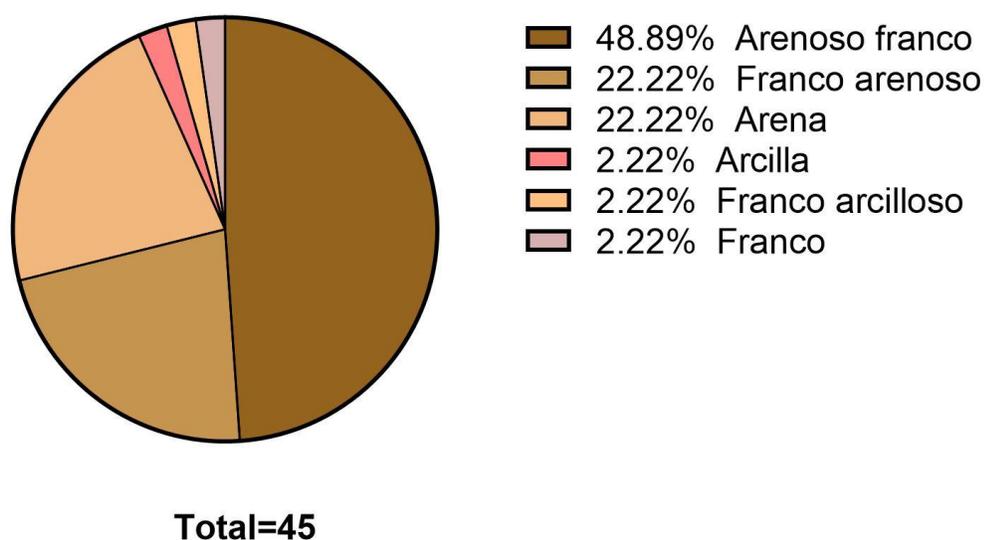


Figura 27. Clasificación de tipos de suelo para todos los sitios muestreados. El mayor porcentaje de sitios muestreados presentó suelos de tipo arenoso franco (48.89%).

3.6.4 Determinación del pH del suelo

En cuanto al pH de las muestras de suelo, VDP presentó una media de 5.84, RC de 7.11, RG de 6.52 y SJZ de 6.70 con diferencias significativas entre VDP, RC y SJZ (Figuras 28 y 29). El valor más alto en cuanto a pH fue de 7.72 en RC y el valor mínimo fue de 4.53 en VDP.

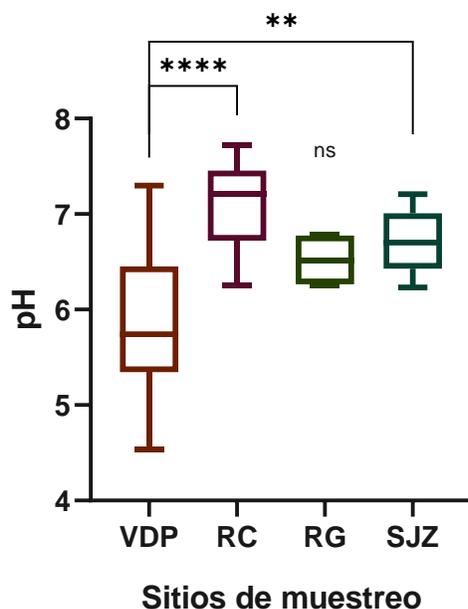


Figura 28. Valores de pH en muestras de suelo de los sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P>0.05$), los asteriscos (**) y (****) indican diferencia significativa entre muestras ($P<0.01$ y $P<0.0001$ respectivamente).

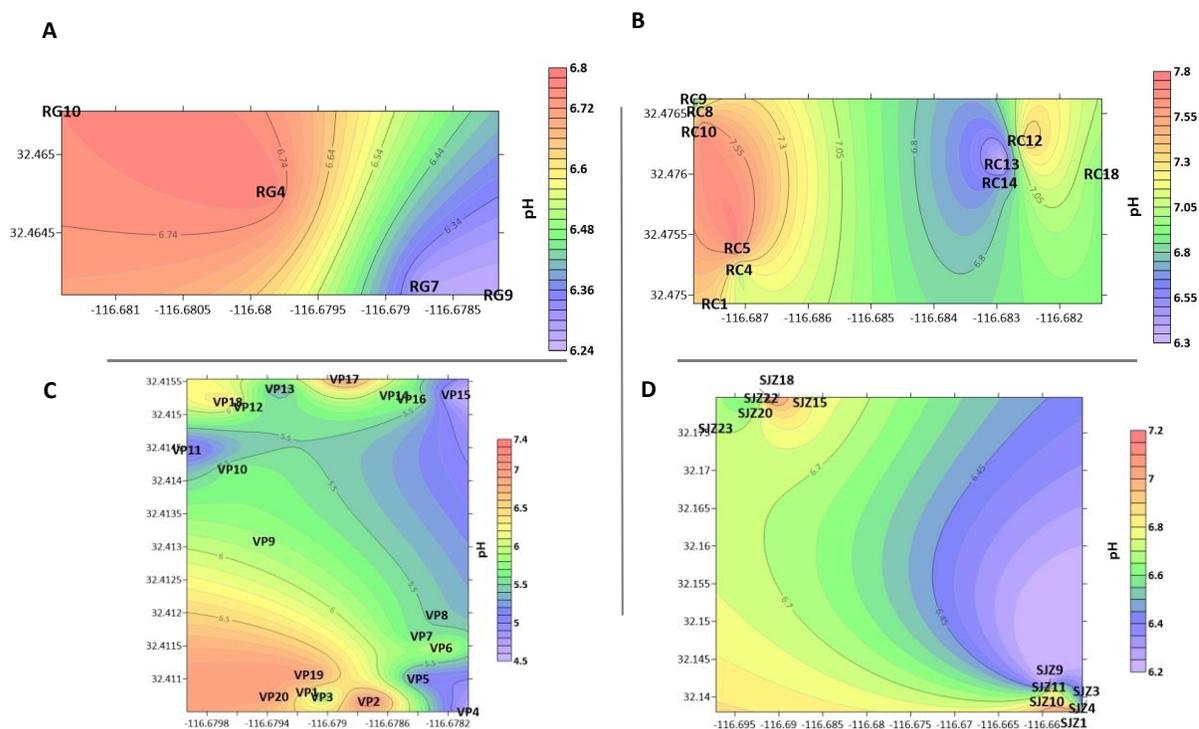


Figura 29. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes al pH. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras.

3.6.5 Determinación de conductividad eléctrica

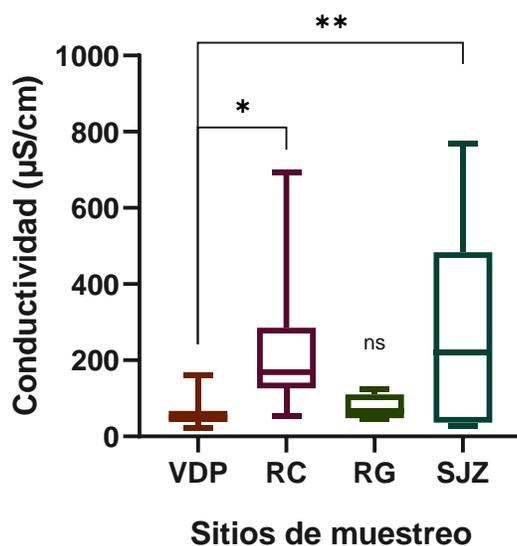


Figura 30. Valores de Conductividad Eléctrica en muestras de suelo de los sitios de muestreo. VDP= Valle de las Palmas, RC= Rancho el Carrizo, RG= Rancho las Golondrinas y SJZ= Comunidad San José de la Zorra. Letras ns indican que no hay diferencia significativa entre muestras ($P>0.05$), el asterisco (*) y (**) indican diferencia significativa entre muestras ($P<0.05$ y $P<0.01$ respectivamente).

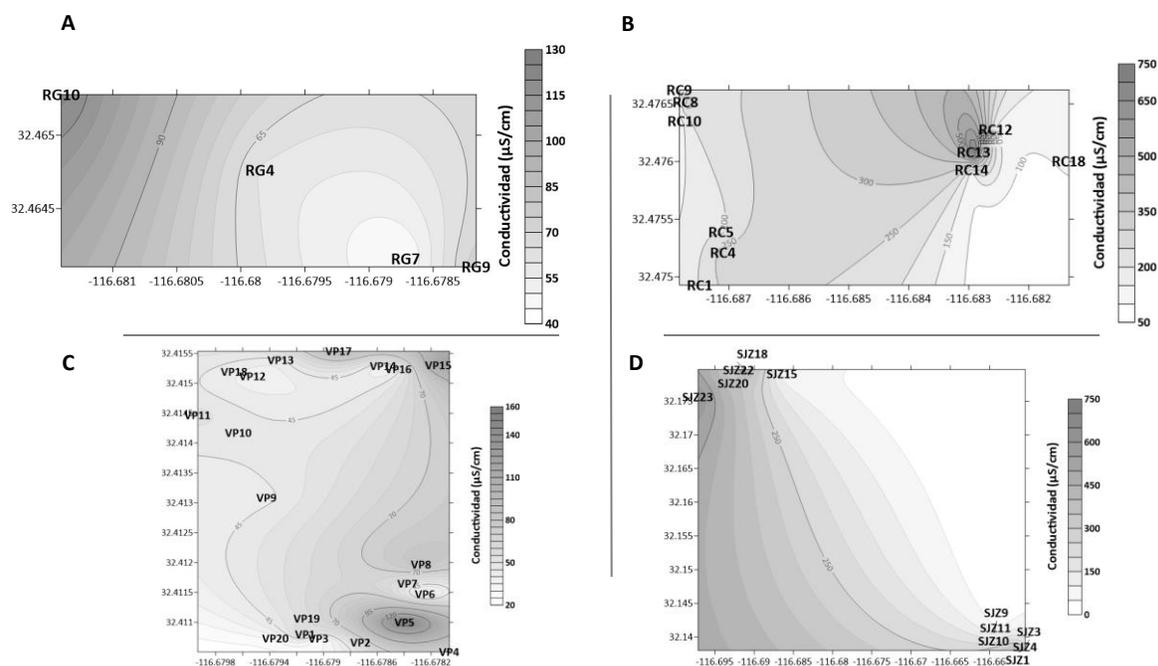


Figura 31. Diagramas de superficie de cada uno de los sitios de muestreo correspondientes a la conductividad eléctrica. A) RG= Rancho Golondrinas, B) RC= Rancho el Carrizo, C) VDP= Valle de las Palmas y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra. La escala indica el porcentaje de humedad de todas las muestras.

Los valores obtenidos de conductividad eléctrica fueron de una media de 59.07 $\mu\text{S}/\text{cm}$, para VDP, 224.61 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para RC, 75.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para RG y de 274.66 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para SJZ. Según los valores obtenidos por el análisis ANOVA mostraron diferencias significativas entre VDP y RC, así como con SJZ (Figura 30 y 31).

3.6.6 Análisis de correlación

Los resultados de correlación realizados para todos los sitios en conjunto mostraron que existe una correlación media entre el contenido de humedad y materia orgánica (0.50) y entre materia orgánica y granulometría (0.58) (Figura 32).

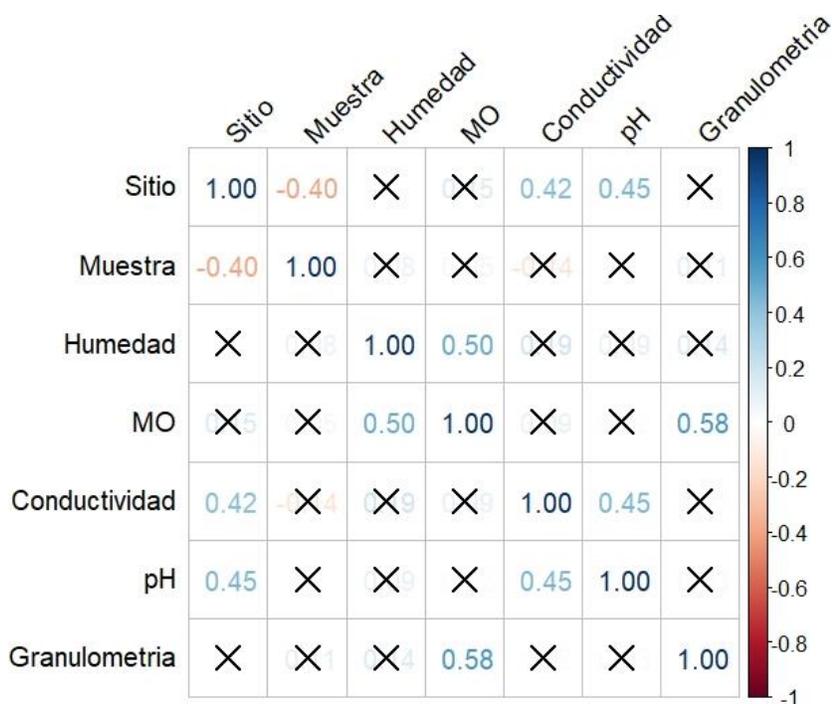


Figura 32. Correlación de variables ambientales en todos los sitios de muestreo. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables. Valores de X indican correlaciones no significativas entre variables.

Los resultados de análisis de correlación para VDP arrojaron que, existe una correlación media entre la muestra y el pH con un valor de 0.46, el contenido de materia orgánica y granulometría con un valor de 0.60, y materia orgánica y pH con un valor de 0.59 (Figura 33).

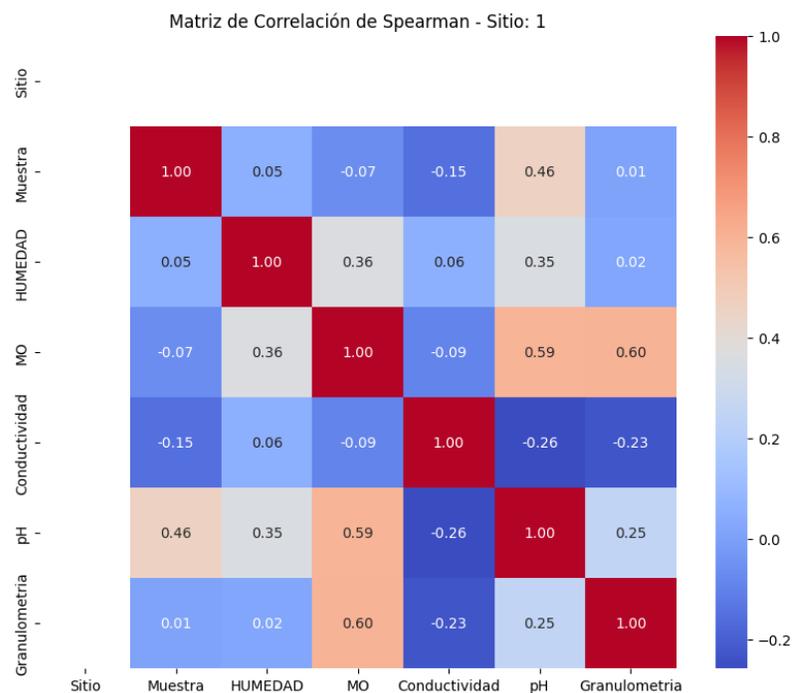


Figura 33. Correlación de variables ambientales en Valle de las Palmas. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre variables.

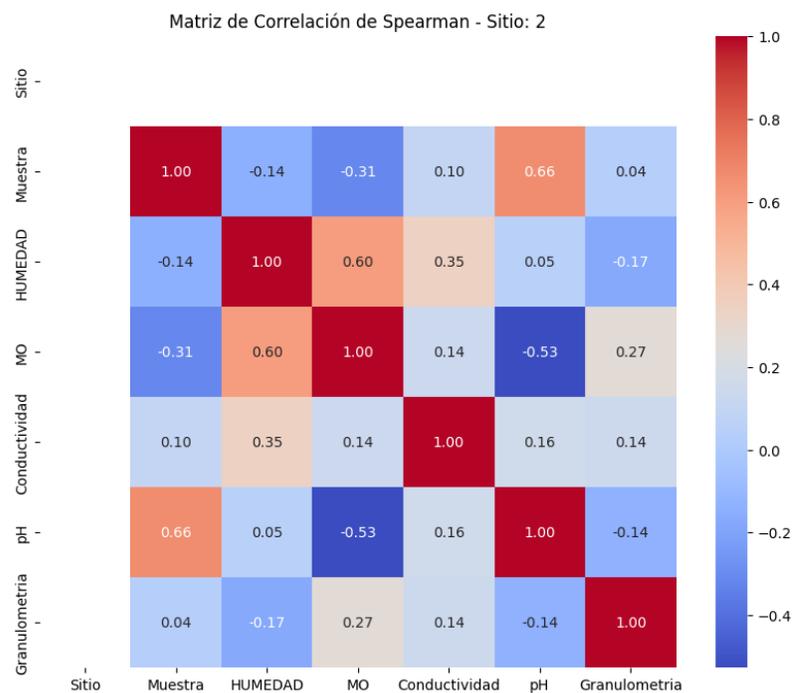


Figura 34. Correlación de variables ambientales en Rancho el Carrizo. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables.

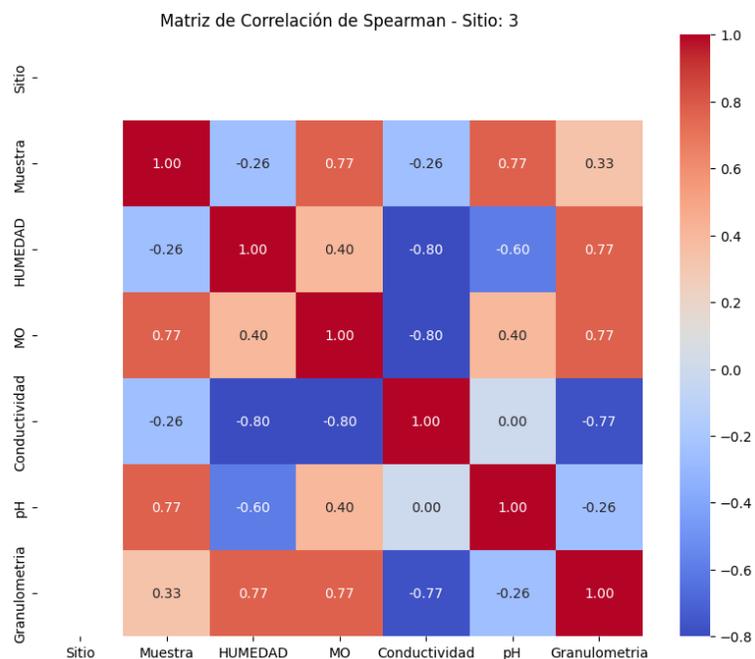


Figura 35. Correlación de variables ambientales en Rancho las Golondrinas. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables.

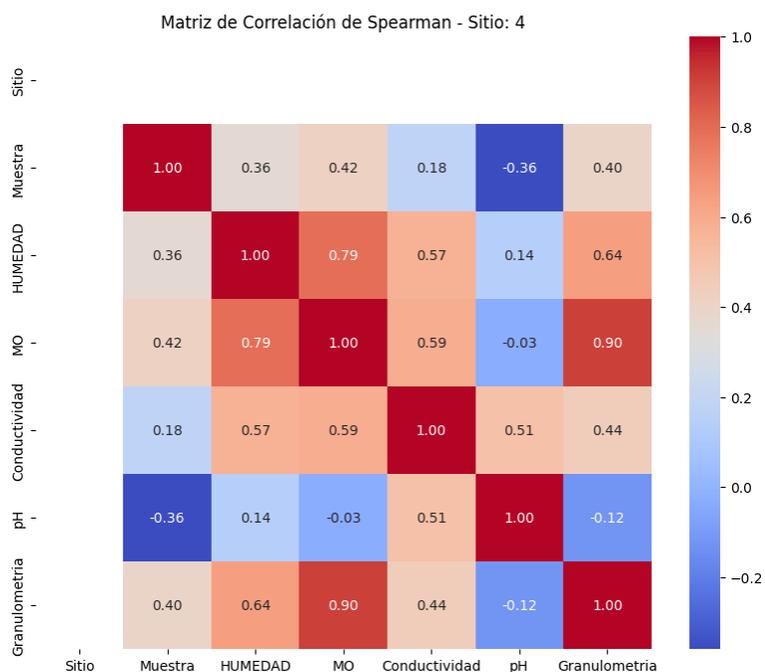


Figura 36. Correlación de variables ambientales en la comunidad San José de la Zorra. Valores cercanos a 1 indican mayor correlación positiva entre las variables.

En cuanto a los resultados de análisis de correlación para RC, las variables con mayor correlación fueron de igual manera la muestra y el pH con un valor de correlación media de 0.66 y el contenido de humedad y materia orgánica con un valor de 0.60 (Figura 34). Para RG, la matriz de correlación arrojó nuevamente

una correlación relativamente alta entre la muestra y el pH con un valor de 0.77 y la muestra y el contenido de materia orgánica con un valor de 0.77 (Figura 35). Finalmente, para SJZ, las variables que presentaron una correlación más alta fueron la humedad y el contenido de materia orgánica con un valor de 0.79, y materia orgánica y granulometría con 0.90 (Figura 36).

3.7 Elaboración de mapas de prevalencia ambiental

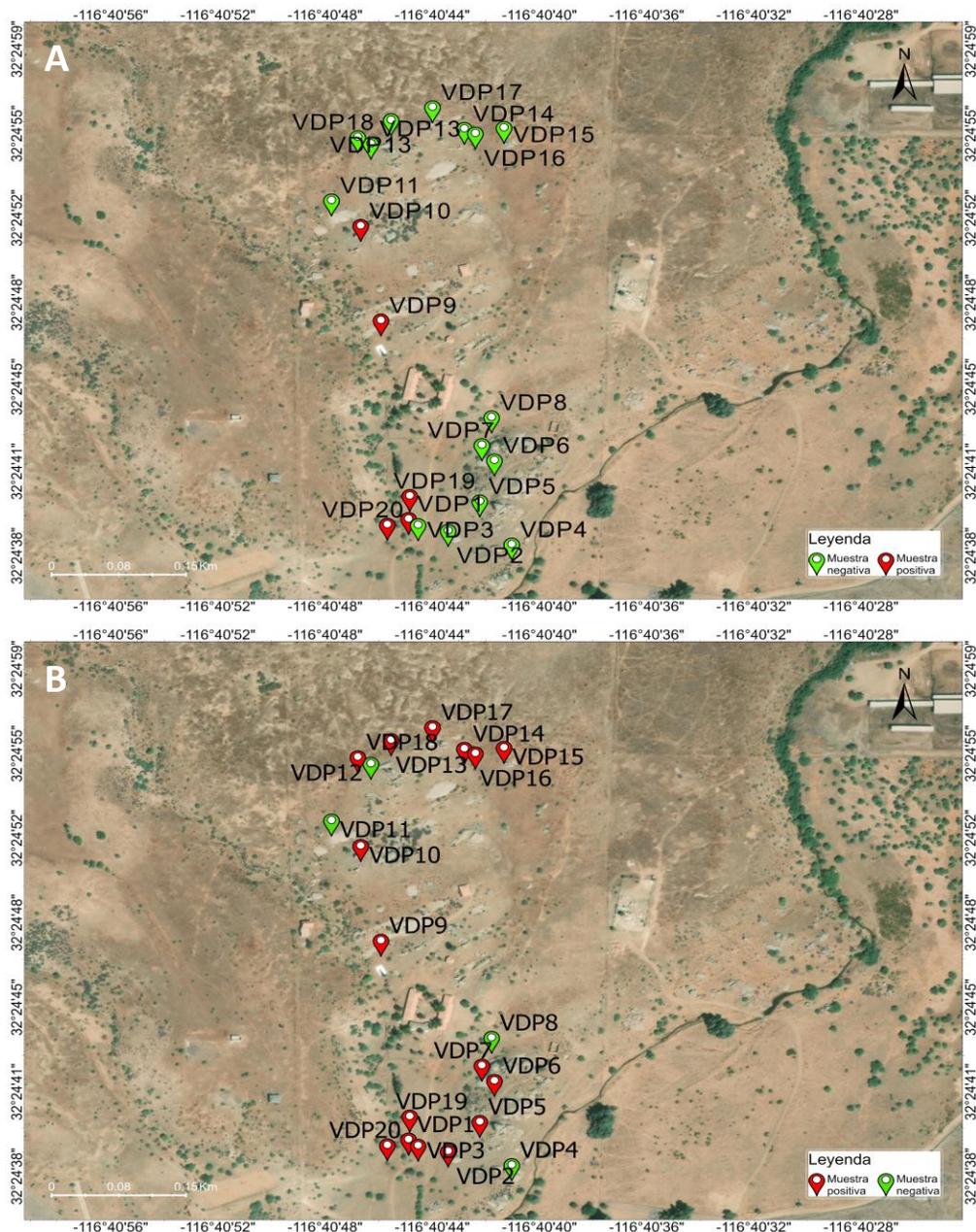


Figura 37. Sitios positivos y negativos mediante PCR anidada y ddPCR en Valle de las Palmas, Baja California. A) Sitios negativos y positivos por PCR Anidada, B) Sitios negativos y positivos por ddPCR.

En la Figura 35, se observa la ubicación de los puntos positivos y negativos a la detección de ADN de *Coccidioides* obtenidos mediante PCR anidada en VDP. Dichos puntos fueron VDP1, VDP9, VDP10, VDP19 y VDP20, mientras que con la técnica ddPCR, se pueden observar un total de 16 puntos positivos (Figura 37).

Como se ha mencionado, en el resto de los sitios (RC, RG, y SJZ), mediante la técnica de detección por PCR anidada, no se obtuvieron resultados positivos en comparación con la ddPCR en la que para RC se obtuvieron 5 muestras positivas (RC1, RC5, RC8, RC10 y RC18), para RG 1 (RG4) y para SJZ 8 (SJZ3, SJZ4, SJZ6, SJZ8, SJZ14, SJZ20, SJZ22, SJZ24) (Figura 38).

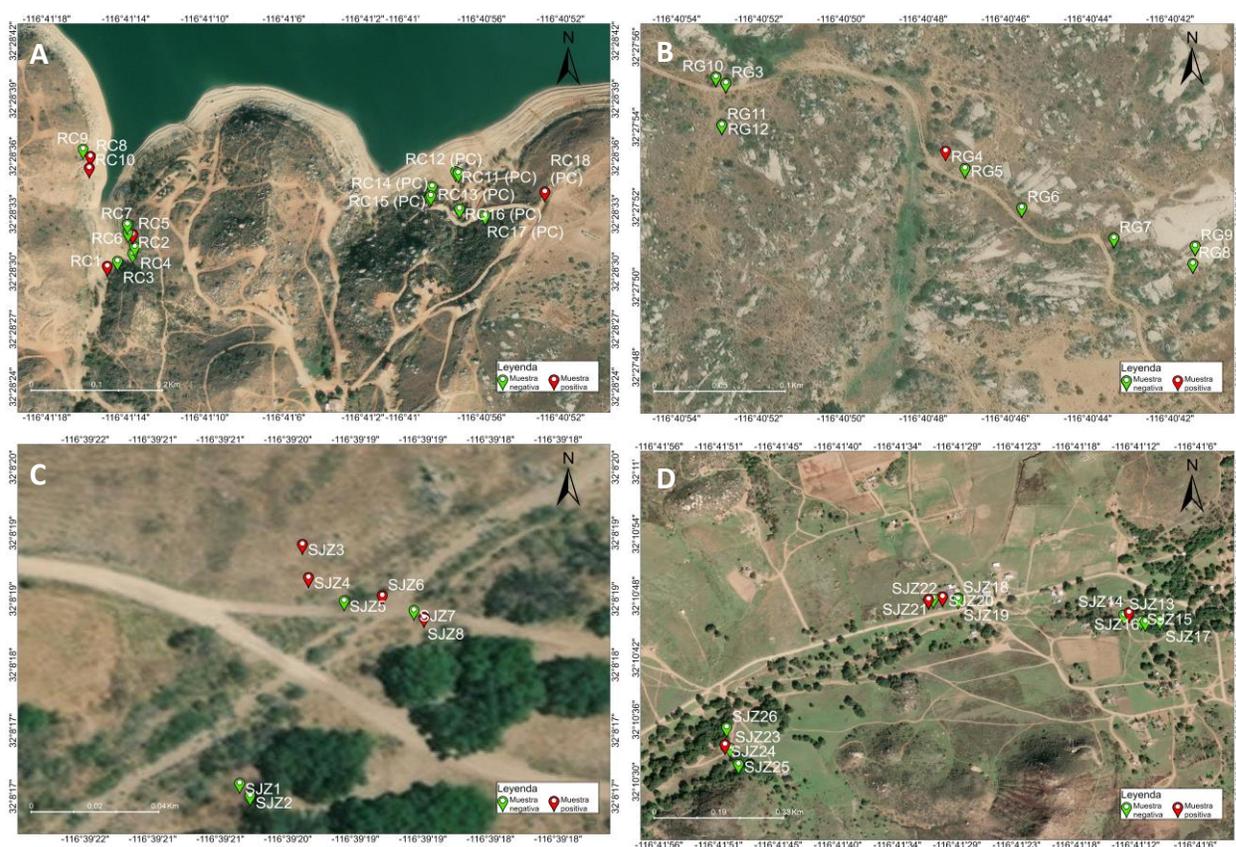


Figura 38. Sitios negativos y positivos por ddPCR. A) RC= Rancho el Carrizo, B) RG= Rancho las Golondrinas, C y D) SJZ= Comunidad San José de la Zorra.

Una vez obtenidos los mapas de ubicación de cada uno de los sitios muestreados, se obtuvieron mapas de prevalencia ambiental con base en los muestreos realizados anteriormente (Baptista-Rosas et al., 2011; Catalán-Dibene et al., 2014 y Vargas-Gastélum et al., 2015) donde se observa la ubicación de los sitios positivos para VP y SJZ (Figura 39 y 40).

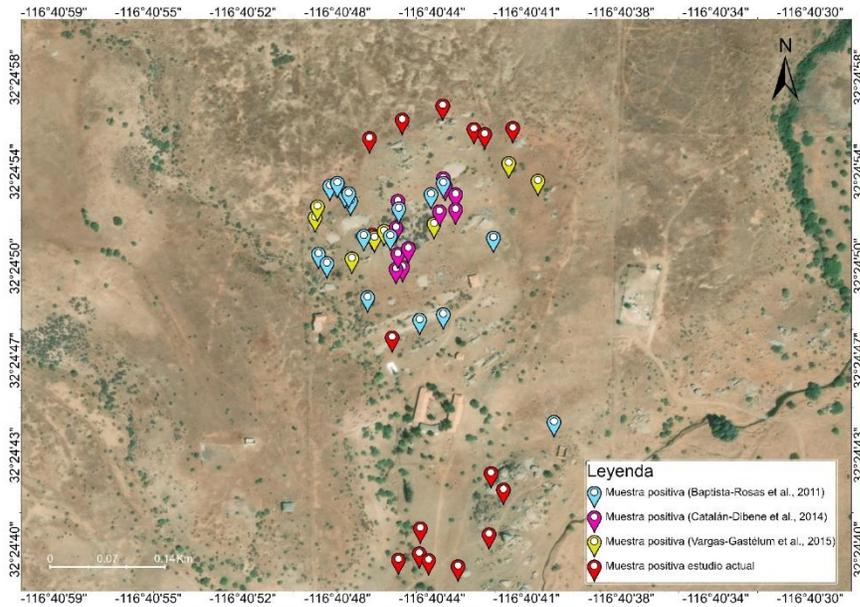


Figura 39. Ubicación de sitios positivos con base en muestreos previos y el actual en Valle de las Palmas, Baja California.

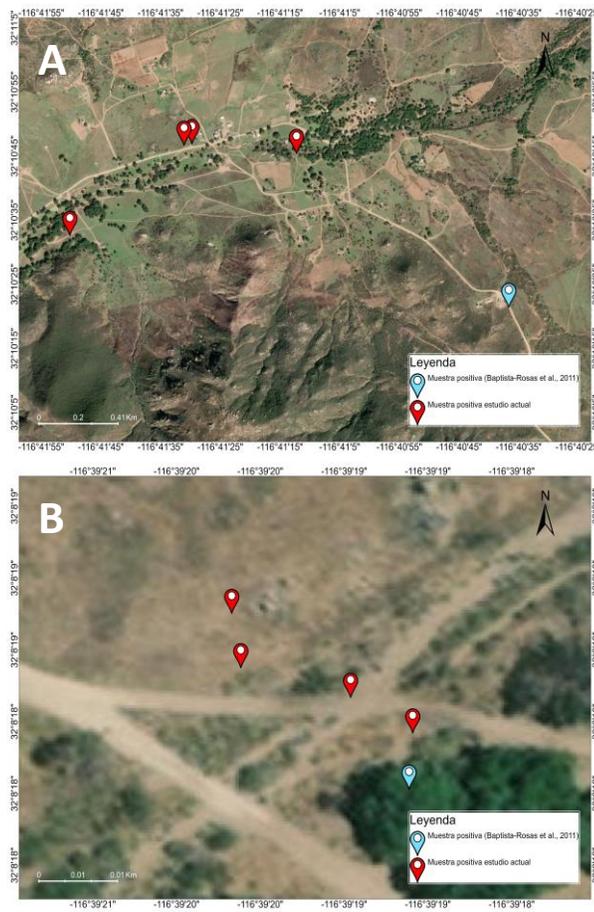


Figura 40. Ubicación de sitios positivos con base en muestreos previos y el actual en San José de la Zorra, Baja California.

Capítulo 4. Discusión

4.1 PCR anidada y ddPCR

En el presente proyecto, se analizó la distribución actual de *Coccidioides* spp. en muestras de suelo en distintos sitios de muestreo, además de comparar la técnica ddPCR contra la PCR anidada para evaluar un método de mejor detección.

Al comparar los resultados analizados en las muestras de suelo mediante la técnica PCR anidada y ddPCR, se observó una mayor cantidad de muestras positivas mediante la técnica ddPCR. Para el sitio de VDP, de las 20 muestras analizadas, por PCR anidada se obtuvieron solamente 5 muestras positivas (1, 9, 10, 19 y 20), lo que representa un 25 % del total de las muestras, en comparación con la ddPCR en donde se obtuvieron 16 muestras positivas (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) lo que representa un 80 % del total de las muestras. Las 5 muestras positivas mediante PCR anidada también lo fueron por la ddPCR.

Por otro lado, no se obtuvo ningún resultado de muestras positivas mediante PCR anidada para los sitios de RC, RG y SJZ. Sin embargo, al realizar el análisis correspondiente de la ddPCR se obtuvieron 5 muestras positivas en RC (1, 5, 8, 10 y 18), lo que equivale al 27.7 %, 1 para RG (4), lo que equivale al 8.3 % del total de las muestras y 8 para SJZ (3, 4, 6, 8, 14, 20, 22 y 24), dando un total del 30 % del total de las muestras.

En estudios previos utilizando PCR anidada seguida de una PCR diagnóstica, obtuvieron 32 sitios positivos para *Coccidioides* spp. en donde 27 de 70 muestras fueron positivas para VDP y solamente 17 de las 27 fueron de madrigueras; 5/20 para SJZ y 10 muestras positivas a *Coccidioides* en muestras de suelo para VDP (Baptista-Rosas et al., 2011; Catalán-Dibene et al., 2014). En comparación con los resultados de este proyecto, donde se obtuvieron 5 de 20 muestras positivas para VDP y ninguna muestra positiva para SJZ por PCR anidada. Este mayor número de muestras positivas pudo deberse a que los sitios de muestreo fueron en mayor cantidad en comparación con el nuestro.

Sin embargo, con la ddPCR para VDP se obtuvieron 16/20 muestras positivas para VDP y 8/26 muestras positivas para SJZ. Cabe mencionar que en la técnica de PCR anidada realizada por Baptista-Rosas y Catalán utilizaron la región ITS2 específica para *Coccidioides* spp. con los oligonucleótidos ITS2F e ITS2R, en

comparación con nuestra técnica en la que se utilizaron los oligonucleótidos ITS1F e ITS1R específicos para *Coccidioides* spp. diseñados por Vargas-Gastélum y colaboradores en 2015, la cual obtuvo 11/40 amplicones positivos como *Coccidioides* spp., de los cuales 9 fueron obtenidos de madrigueras y 2 de la capa superficial del suelo.

En relación con el uso de la técnica ddPCR, ya se han realizado estudios utilizando la ddPCR para la detección de tres géneros de hongos como *Pneumocystis*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* (Guo et al., 2023). En el presente estudio, se utilizó la ddPCR como técnica para determinar la presencia de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales.

El umbral establecido para este experimento fue un umbral manual excluyendo las gotas de los controles negativos. A pesar de que con la técnica ddPCR se obtuvieron resultados positivos en cada uno de los sitios, indicando la presencia de *Coccidioides* en las muestras de suelo, una vez que se ha determinado el límite de detección, es importante señalar la posibilidad de que existan falsos positivos especialmente para muestras ambientales, por una mala interpretación de la fluorescencia o por artefactos que se pueden producir, además de que aquellos que tengan lo que se conoce como “lluvia significativa” y que se da más en muestras ambientales, se debe intentar optimizar el ensayo (Kokkoris et al., 2021)

Merece la atención mencionar que, a pesar de establecer un umbral alto para discriminar gotas en los NTCs como falsos positivos y dejar únicamente 1 evento positivo como límite para todas las muestras, estas señales de falsos positivos pudieron haber contribuido a tener una mayor cantidad de muestras positivas que con la técnica de PCR anidada. A su vez, es importante mencionar que, para descartar cualquier falso positivo dentro de las muestras, esta técnica de ddPCR en especial, no permite realizar la secuenciación de las muestras para identificar si estos fueron posibles artefactos (Kiselinova et al., 2014). Es necesario continuar haciendo estudios relacionados con muestras ambientales para comprender mejor su funcionamiento en la ddPCR y evitar así falsos positivos entre las muestras.

4.2 Parámetros de suelo

En un estudio sobre suelos de Arizona, California y Utah se analizaron varios parámetros de suelo similares a los estudiados en el presente proyecto de investigación, tales como: pH, conductividad eléctrica, salinidad, aniones seleccionados, textura, mineralogía, tipos y densidad de vegetación, geomorfología general y entornos ecológicos (Fisher et al., 2007). Los resultados mostraron que ninguno de estos

parámetros, a excepción de la temperatura y la textura del suelo, son indicativos de la presencia de *Coccidioides*. Los mismos autores señalaron que los suelos de tipo arena franca o franco arenoso son tipos de suelo en los que se ha detectado la presencia de este organismo, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde un alto porcentaje de los suelos con muestras positivas son de tipo arenoso franco y franco arenoso (46 % y 19 % respectivamente).

En un estudio previo, se encontró una correlación entre el pH del suelo (con rangos entre 6.9 y 8.0) y suelos positivos para *Coccidioides* (Barker et al., 2012), lo cual coincide con el análisis realizado en este estudio, donde se observó una correlación moderada entre la muestra y el pH: 0.455 para VDP, 0.661 para RC y 0.774 para RG. Sin embargo, en otros estudios se encontró una correlación entre altas concentraciones de elementos inorgánicos como el boro, calcio, magnesio, sodio y silicio y la presencia de *Coccidioides* (Chow et al., 2016), sin asociación alguna entre el pH y la presencia del hongo.

En otro trabajo, al comparar los resultados obtenidos de los parámetros de suelo, en donde se analizaron humedad, materia orgánica, pH y capacidad de retención del agua en cada una de las muestras, mostraron que para VDP obtuvieron porcentajes de humedad de 0.340 %, un contenido de materia orgánica 0.428 %, un pH entre 6.85 y 6.78 (Romero-Olivares et al., 2013), en comparación con nuestros resultados, los cuales mostraron un promedio de 0.44 % de humedad, 1.60 % en cuanto al contenido de materia orgánica y un pH de 5.84

En otro estudio, se analizaron muestras de suelo en VDP en dos estaciones (verano e invierno) en dos microhábitats (madrigueras de roedores y en la superficie del suelo) y analizaron parámetros como el contenido de humedad, materia orgánica, textura del suelo y conductividad eléctrica. En el caso de las madrigueras en verano, sus resultados arrojaron un contenido de humedad de $0.71 \pm 0.73\%$, un contenido de materia orgánica de $1.9 \pm 1.12 \%$, pH de 5.81 ± 0.29 y electroconductividad de 0.72 ± 0.61 mS (Vargas-Gastélum et al., 2015).

A pesar de analizar parámetros ambientales similares a los de este trabajo (humedad, materia orgánica, pH, conductividad eléctrica y granulometría), los estudios mencionados anteriormente no establecen claramente una correlación entre los parámetros ambientales y la presencia/ausencia del hongo.

En un estudio de Weaver y Kollivas en 2018, se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar las relaciones estacionales entre la incidencia de la enfermedad y variables climáticas, tales como precipitación, temperatura, índice de gravedad de la sequía de Palmer, ráfagas de viento y la calidad del

aire, con datos obtenidos del año 2000 al 2015. Encontraron una correlación altamente significativa entre la incidencia de la enfermedad y la precipitación del invierno anterior, sugiriendo que la precipitación proporciona la humedad necesaria para el crecimiento del hongo.

Por otro lado, Gorris y colaboradores en 2018 realizaron un estudio que evaluó cómo los factores ambientales influyen en la incidencia de la Fiebre del Valle durante el periodo del 2000 al 2015, encontrando que la temperatura y la humedad del suelo desempeñan un papel fundamental en la incidencia de esta enfermedad. Además, los autores señalan que las regiones con alta incidencia de Fiebre del Valle presentan una combinación de factores climáticos.

Reportes similares encontraron que parámetros como las PM10 (partículas de menos de 10 micrómetros), la precipitación, la temperatura máxima, y la velocidad del viento son importantes para predecir la incidencia de coccidioidomicosis. En particular, señalaron que la temperatura máxima mensual, el promedio de PM10 y la precipitación total un mes antes de la notificación de casos fueron variables significativas para predecir la Fiebre del Valle (Kollath et al., 2022).

Sin embargo, en los análisis realizados en este estudio, no se encontró una correlación significativa entre las muestras y el porcentaje de humedad en ninguno de los sitios, ni en el análisis conjunto de todos los sitios (Figura 38), aunque no se evaluó la humedad ambiental en series de tiempo, es decir, los resultados de este trabajo no consideran la precipitación anual ni la de años anteriores, lo cual podría explicar las diferencias entre ambos estudios.

Si bien en el presente trabajo no se analizó la salinidad del suelo, diversos estudios sugieren que esta se relaciona con la presencia de *Coccidioides* en el suelo, y que altos contenidos de salinidad pueden suprimir el crecimiento de distintos tipos de hongos y bacterias antagonistas (Elconin et al., 1964; Egeberg et al., 1964). Una posible explicación a los resultados de este estudio en cuanto a las variables ambientales y la presencia de *Coccidioides*, al no encontrar una correlación clara, es la hipótesis del reservorio endozoario propuesta por Emmons en 1943. Esta hipótesis sugiere que los pequeños mamíferos fungen como hospederos, permitiendo la existencia de ambas especies de *Coccidioides* al vivir en forma de esférulas sin causarles enfermedad, proporcionando un hábitat adecuado hasta que el animal muere y el hongo puede acceder a la materia orgánica disponible, manteniéndose en el ambiente.

Si bien existe una correlación entre los parámetros de suelo y la presencia de *Coccidioides*, también podría haber una relación entre estos parámetros y el crecimiento de las plantas que alimentan a los pequeños

roedores, incrementando la abundancia de ambos. Cuando estos animales mueren, si están infectados con el hongo, los granulomas presentes en el hospedero podrían transformarse en hifas para posteriormente formar esporas en el suelo y reiniciar el ciclo (Taylor y Barker, 2019).

En general, es importante continuar investigando los parámetros ambientales y del suelo, así como el efecto de estas variables en el crecimiento de las plantas que alimentan a los pequeños mamíferos que fungen como reservorios y que dan sustento a estos hongos. Aunado a ello, cabe señalar que el suelo es uno de los sistemas más complejos de análisis debido a los cambios constantes en todos sus componentes a lo largo del tiempo (Fisher et al., 2007), y el estudio de los sitios de ubicación de *Coccidioides* sigue siendo un tema que requiere mayor investigación para lograr un mejor entendimiento.

4.3 Mapas de prevalencia ambiental

Si bien las técnicas utilizadas para la detección de muestras de suelo de *Coccidioides* realizadas en estudios anteriores (Baptista-Rosas et al., 2011; Catalán-Dibene et al., 2014; Vargas-Gastélum et al., 2015) fueron mediante PCR anidada y en el presente se propuso el uso de la ddPCR, podemos observar que, a pesar de no muestrear directamente en los mismos sitios, sí existe un patrón de agrupamiento entre las muestras positivas para cada uno de los muestreos realizados en VDP.

En el caso de SJZ, solamente una de las muestras que anteriormente había dado positiva se encuentra cercana a una del presente estudio, por lo que se sugiere que las condiciones ambientales y/o del suelo son similares. Es importante mencionar, que no se cuentan con los parámetros ambientales muestreados para los estudios de Catalán-Dibene et al., 2014 y Baptista-Rosas et al., 2011, por lo que no se pudiera hacer inferencia de si existen condiciones similares para las muestras positivas del presente estudio.

En el caso del muestreo realizado por Vargas-Gastélum et al., 2015, a pesar de haber analizado distintos parámetros, no existió correlación entre ellos y las muestras que dieron positivo a *Coccidioides* spp.

Si bien la creación de estos mapas de prevalencia ambiental sugiere una distribución actual de *Coccidioides* spp. en las muestras de suelo de Baja California, es necesario continuar con el estudio relacionado al nicho ecológico de estas especies para la elaboración de mapas más actualizados, así como la necesidad de continuar con muestreos dirigidos que brinden un panorama más amplio respecto a la distribución de éstas.

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

El presente proyecto fue el primer acercamiento del uso de la técnica de ddPCR para el diagnóstico de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales, en el cual se obtuvieron resultados favorables con el uso de esta técnica al detectar un mayor número de muestras positivas en comparación con la PCR anidada.

Valle de las Palmas sigue siendo uno de los sitios en donde se ha logrado encontrar mayor prevalencia de *Coccidioides* spp. en muestras ambientales en Baja California.

Si bien, para cada sitio existió alguna correlación entre parámetros evaluados, tales como la muestra y el pH, podemos concluir que muchos de los parámetros evaluados en sí no determinan una correlación directa con la presencia de *Coccidioides* en las muestras de suelo, pero sí que estos parámetros pueden incidir para favorecer el crecimiento del hongo.

La creación de mapas de prevalencia ambiental es una herramienta importante que brinda la oportunidad de identificar de manera visual los sitios de en donde se encuentra presente *Coccidioides* spp. en muestras de suelo y así, estar en posibilidades de evitar enfermedades en la población cercana a estos sitios.

Es necesario seguir realizando estudios que conlleven el análisis de distintas variables, tales como parámetros ambientales y parámetros de suelo para tener un panorama más amplio en cuanto al desarrollo y al nicho ecológico de *Coccidioides* spp.

Literatura citada

- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6(8), 769-779. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x>
- Baptista-Rosas, R. C., Catalán-Dibene, J., Romero-Olivares, A. L., Hinojosa, A., Cavazos, T., & Riquelme, M. (2011). Molecular detection of *Coccidioides* spp. from environmental samples in Baja California: linking Valley Fever to soil and climate conditions. *Fungal Ecology*, 5(2), 177-190. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.08.004>
- Baptista-Rosas, R. C., Hinojosa, A., & Riquelme, M. (2007). Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western north American deserts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1111(1), 35-46. <https://doi.org/10.1196/annals.1406.003>
- Barker, B. M., Tabor, J. A., Shubitz, L. F., Perrill, R., & Orbach, M. J. (2011). Detection and phylogenetic analysis of *Coccidioides posadasii* in Arizona soil samples. *Fungal Ecology*, 5(2), 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.07.010>
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Biorad Droplet Digital PCR Droplet Digital PCR Applications Guide.(2018). Bulletin 6407,1-145. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf
- Cairns, L., Blythe, D., Kao, A., Pappagianis, D., Kaufman, L., Kobayashi, J., & Hajjeh, R. (2000). Outbreak of Coccidioidomycosis in Washington state residents returning from Mexico. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1), 61-64. <https://doi.org/10.1086/313602>
- Banda-Castro, A. L., Pinto-Martínez, A. M., & Castillo, N. S. C. (2018). Acciones prácticas en materia de sustentabilidad. *Qartuppi eBooks*. <https://doi.org/10.29410/qtp.18.08>
- Catalán-Dibene, J., Johnson, S. M., Eaton, R., Romero-Olivares, A. L., Baptista-Rosas, R. C., Pappagianis, D., & Riquelme, M. (2014). Detection of coccidioidal antibodies in serum of a small rodent community in Baja California, Mexico. *Fungal Biology*, 118(3), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.01.006>
- Chow, N. A., Kangiser, D., Gade, L., McCotter, O. Z., Hurst, S., Salamone, A., Wohrle, R., Clifford, W., Kim, S., Salah, Z., Oltean, H. N., Plumlee, G. S., & Litvintseva, A. P. (2021). Factors influencing distribution of *Coccidioides immitis* in soil, Washington State, 2016. *mSphere*, 6(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00598-21>
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2024). Droplet Digital PCR (ddPCR) Technology. <https://www.bio-rad.com/es-mx/life-science/learning-center/introduction-to-digital-pcr/what-is-droplet-digital-pcr>
- Egeberg, R. O., Elconin, A. E., & Egeberg, M. C. (1964). Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *Journal of Bacteriology*, 88(2), 473-476. <https://doi.org/10.1128/jb.88.2.473-476.1964>

- Elconin, A. F., Egeberg, R. O., & Egeberg, M. C. (1964). Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *Journal of Bacteriology*, 87(3), 500-503. <https://doi.org/10.1128/jb.87.3.500-503.1964>
- Emmons, C.W. (1943). A reservoir of coccidioidomycosis in wild rodents. *Journal of Bacteriology*, 45, 306. Archivo PDF.
- Emmons, C. W., & Ashburn, L. L. (1942). The Isolation of *Haplosporangium parvum* n. sp. and *Coccidioides immitis* from wild rodents. Their relationship to Coccidioidomycosis. *Public Health Reports (1896-1970)*, 57(46), 1715. <https://doi.org/10.2307/4584276>
- Fisher, M. C., Koenig, G. L., White, T. J., & Taylor, J. W. (2002). Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., Previously recognized as the non-california population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*, 94(1), 73. <https://doi.org/10.2307/3761847>
- Fisher, F. S., Bultman, M. W., Johnson, S. M., Pappagianis, D., & Zaborsky, E. (2007). *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1111(1), 47-72. <https://doi.org/10.1196/annals.1406.031>
- Friedman, L., Smith, C. E., Pappagianis, D., & Berman, R. J. (1956). Survival of *Coccidioides immitis* under controlled conditions of temperature and humidity. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 46(10), 1317-1324. <https://doi.org/10.2105/ajph.46.10.1317>
- Galgiani, J. N., Ampel, N. M., Blair, J. E., Catanzaro, A., Johnson, R. H., Stevens, D. A., & Williams, P. L. (2005). Coccidioidomycosis. *Clinical Infectious Diseases*, 41(9), 1217-1223. <https://doi.org/10.1086/496991>
- Georg, L. K., Ajello, L., & Gordon, M. A. (1951). A selective medium for the isolation of *Coccidioides immitis*. *Science*, 114(2963), 387-389. <https://doi.org/10.1126/science.114.2963.387.b>
- Gorris, M. E., Cat, L. A., Zender, C. S., Treseder, K. K., & Randerson, J. T. (2017). Coccidioidomycosis dynamics in relation to climate in the Southwestern United States. *GeoHealth*, 2(1), 6-24. <https://doi.org/10.1002/2017gh000095>
- Greene, D. R., Koenig, G., Fisher, M. C., & Taylor, J. W. (2000). Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*, 92(3), 406-410. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061175>
- Guo, J., Tian, W., Lin, H., Hu, L., Gao, X., Xia, J., Yu, H., Chen, H., Li, W., & Wu, W. (2023). Analytical and clinical validation of multiplex droplet digital PCR assay for detecting pathogenic fungal infection in lungs. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, 15(1), 110-119. <https://doi.org/10.1080/21501203.2023.2296941>
- Hauke, J., & Kossowski, T. (2011). Comparison of values of Pearson's and Spearman's correlation coefficients on the same sets of data. *Quaestiones Geographicae*, 30(2), 87-93. <https://doi.org/10.2478/v10117-011-0021-1>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., . . . Colston, B. W. (2011).

- High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Kirkland, T. N., & Fierer, J. (1996). Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerging Infectious Diseases*, 2(3), 192-199. <https://doi.org/10.3201/eid0203.960305>
- Kiselinova, M., Pasternak, A. O., De Spiegelare, W., Vogelaers, D., Berkhout, B., & Vandekerckhove, L. (2014). Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA. *Plos One*, 9(1), e85999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085999>
- Kokkoris, V., Vukicevich, E., Richards, A., Thomsen, C., & Hart, M. M. (2021). Challenges using droplet digital PCR for environmental samples. *Applied Microbiology*, 1(1), 74-88. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1010007>
- Kolivras, K. N., Johnson, P. S., Comrie, A. C., & Yool, S. R. (2001). Environmental variability and coccidioidomycosis (Valley Fever). *Aerobiologia*, 17(1), 31-42. <https://doi.org/10.1023/a:1007619813435>
- Kolivras, K. N., & Comrie, A. C. (2003). Modeling Valley Fever (coccidioidomycosis) incidence on the basis of climate conditions. *International Journal of Biometeorology*, 47(2), 87-101. <https://doi.org/10.1007/s00484-002-0155-x>
- Kollath, D. R., Mihaljevic, J. R., & Barker, B. M. (2022). PM10 and other climatic variables are important predictors of seasonal variability of Coccidioidomycosis in Arizona. *Microbiology Spectrum*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01483-21>
- Kollath, D. R., Teixeira, M. M., Funke, A., Miller, K. J., & Barker, B. M. (2019). Investigating the role of Animal burrows on the ecology and distribution of *Coccidioides* spp. in Arizona soils. *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00391-2>
- Laniado-Laborin, R., Álvarez-Cerro, M. & Cárdenas-Moreno, R.P. (1991). Tijuana: zona endémica por infección por *Coccidioides immitis*. *Salud Pública de México*, 33(3), 235-239. <https://www.redalyc.org/pdf/106/10633305.pdf>
- Liu, J., Li, C., Muhae-Ud-Din, G., Liu, T., Chen, W., Zhang, J., & Gao, L. (2020). Development of the droplet digital PCR to detect the teliospores of *Tilletia controversa* Kühn in the soil with greatly enhanced sensitivity. *Frontiers In Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00004>
- Luna-Isaac, J. A., Muniz-Salazar, R., Baptista-Rosas, R. C., Enriquez-Paredes, L. M., Castanon-Olivares, L. R., Contreras-Perez, C., Bazan-Mora, E., Gonzalez, G. M., & Gonzalez-Martinez, M. R. (2014). Genetic analysis of the endemic fungal pathogens *Coccidioides posadasii* and *Coccidioides immitis* in Mexico. *Medical Mycology*, 52(2), 156-166. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt005>
- Maddy, K. T., & Coccozza, J. (1964). The probable geographic distribution of *Coccidioides immitis* in Mexico. *PubMed*, 57, 44-54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14175564>
- Martin, K. J., & Rygielwicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>

- Maddy, K. T. (1965). Observations on *coccidioides immitis* found growing naturally in soil. *Arizona medicine*, 22, 281–288. Archivo PDF.
- McCotter, O. Z., Benedict, K., Engelthaler, D. M., Komatsu, K., Lucas, K. D., Mohle-Boetani, J. C., Oltean, H., Vugia, D., Chiller, T. M., Cooksey, G. L. S., Nguyen, A., Roe, C. C., Wheeler, C., & Sunenshine, R. (2018). Update on the epidemiology of Coccidioidomycosis in the United States. *Medical Mycology*, 57, S30-S40. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy095>
- Malagnoux, M., Sene, E.H. y Atzmon, N. (2007). Bosques, árboles y agua en las tierras áridas: un equilibrio delicado. *Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales*, 58, 24-26. <https://www.fao.org/4/a1598s/a1598s00.pdf>
- Mead, H. L., Kollath, D. R., De Melo Teixeira, M., Roe, C. C., Plude, C., Nandurkar, N., Donohoo, C., O'Connor, B. L. W., Terriquez, J., Keim, P., & Barker, B. M. (2022). Coccidioidomycosis in Northern Arizona: an investigation of the host, pathogen, and environment using a disease triangle approach. *mSphere*, 7(5). <https://doi.org/10.1128/msphere.00352-22>
- Medrano, F. G. (2012). *Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación*. Instituto Nacional de Ecología. Archivo PDF.
- Nguyen, C., Barker, B. M., Hoover, S., Nix, D. E., Ampel, N. M., Frelinger, J. A., Orbach, M. J., & 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. <https://doi.org/10.1128/cmr.00005-13>
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J., & Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5544-5550. <https://doi.org/10.1128/aem.71.9.5544-5550.2005>
- Ocampo-Chavira, P., Eaton-Gonzalez, R., & Riquelme, M. (2020). Of mice and fungi: *Coccidioides* spp. distribution models. *Journal of Fungi*, 6(4), 320. <https://doi.org/10.3390/jof6040320>
- Poh, T. Y., Ali, N. A. B. M., Chan, L. L., Tiew, P. Y., & Chotirmall, S. H. (2020). Evaluation of droplet digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) for the absolute quantification of *Aspergillus* species in the human airway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3043. <https://doi.org/10.3390/ijms21093043>
- Rebekić, A., Lončarić, Z., Petrović, S., & Marić, S. (2015). Pearson's or Spearman's correlation coefficient - which one to use? *Poljoprivreda*, 21(2), 47-54. <https://doi.org/10.18047/poljo.21.2.8>
- Romero-Olivares, A. L., Baptista-Rosas, R. C., Escalante, A. E., Bullock, S. H., & Riquelme, M. (2012). Distribution patterns of *Dikarya* in arid and semiarid soils of Baja California, Mexico. *Fungal Ecology*, 6(1), 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.09.004>
- Soil Science Division Staff (2017). Soil survey manual. Ditzler, C., Scheffe, K. & Monger, H.C. (Eds). USDA Handbook 18. Government Printing Office, Washington, D.C. <https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-09/The-Soil-Survey-Manual.pdf>
- Stewart, R. A., & Meyer, K. F. (1932). Isolation of *Coccidioides Immitis* (stiles) from the soil. *Experimental Biology and Medicine*, 29(8), 937-938. <https://doi.org/10.3181/00379727-29-6159>

- Taylor, J. W., & Barker, B. M. (2019). The endozoan, small-mammal reservoir hypothesis and the life cycle of *Coccidioides* species. *Medical Mycology*, 57, S16-S20. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy039>
- Vargas-Gastélum, L., Romero-Olivares, A. L., Escalante, A. E., Rocha-Olivares, A., Brizuela, C., & Riquelme, M. (2015). Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv044>
- Wang, D., Liu, E., Liu, H., Jin, X., Niu, C., Gao, Y., & Su, X. (2023). A droplet digital PCR assay for detection and quantification of *Verticillium nonalfalfae* and *V. albo-atrum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1110684>
- Weaver, E. A., & Kolivras, K. N. (2018). Investigating the relationship between climate and Valley Fever (Coccidioidomycosis). *EcoHealth*, 15(4), 840-852. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1375-9>

Anexos

Anexo A

Tabla 9. Parámetros de los 20 puntos de muestreo de Valle de las Palmas, Baja California.

Punto de muestreo	Coordenada Y	Coordenada X	Temperatura (°C)	Velocidad del viento (m/s)	Tipo de vegetación principal	Textura del suelo	Compactación del suelo	Condición de humedad observable	Lugar de obtención de la muestra	Especie
VDP1	32.410799	-116.679134	22	6	Pastizal	Textura media	Compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
VDP2	32.410662	-116.678724	22	1.8	Pastizal	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	Pasto
VDP3	32.4107279	-116.6790353	22	3.3	Chaparral-matorral	Textura gruesa	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP4	32.4105047	-116.6780647	26	2	Chaparral-matorral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP5	32.4110014	-116.6783962	21.8	1.6	Chaparral-matorral	Textura fina	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP6	32.4114729	-116.6782442	21.5	1.6	Matorral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP7	32.411648	-116.6783743	23.4	1.6	Chaparral-matorral	Textura media	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	<i>Cneridium</i>
VDP8	32.4119681	-116.6782732	20.5	1.8	Chaparral-matorral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP9	32.4130851	-116.6794207	22.5	1.7	Chaparral-matorral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	<i>Cneridium</i>
VDP10	32.4141731	-116.6796304	22.8	1.6	Pastizal	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP11	32.4144661	-116.6799331	22.5	1.7	Chaparral-matorral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP12	32.4151182	-116.6795248	22.5	1.8	Chaparral-matorral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP13	32.4153902	-116.6793154	20.8	1.2	Matorral-Pastizal	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP14	32.4152905	-116.6785559	22.5	1.8	Chaparral-matorral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
VDP15	32.415302	-116.678145	23.5	1.2	Chaparral-matorral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
VDP16	32.415237	-116.6784417	23.4	3.2	Chaparral-matorral	Textura media	Compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	

VDP17	32.4155392	-116.6788861	25.6	2.2	Chaparral-matorral	Textura gruesa	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca (excremento de rata)	
VDP18	32.4151943	-116.6796608	22.1	3.7	Matorral-Pastizal	Textura media	Compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
VDP19	32.4110635	-116.6791225	24.8	1.3	Matorral-Pastizal	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
VDP20	32.4107327	-116.6793546	23.8	1.4	Matorral-Pastizal	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	Mezquite

Anexo B

Tabla 10. Parámetros de los 18 puntos de muestreo de Rancho Carrizo, Baja California.

Punto de muestreo	Coordenada Y	Coordenada X	Temperatura (°C)	Velocidad del viento (m/s)	Tipo de vegetación principal	Textura del suelo	Compactación del suelo	Condición de humedad observable	Lugar de obtención de la muestra	Especie
RC1	32.474929	-116.68748	18.5	2.3	Chaparral	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC2	32.475116	-116.687123	22.5	1.1	Chaparral	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC3	32.475003	-116.687337	20.2	1.4	Chaparral	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC4	32.475211	-116.687094	21.16	1.5	Chaparral	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera asociada a una roca	
RC5	32.47539	-116.687123	21.9	1.6	Chaparral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC6	32.475412	-116.687188	21.6	1.6	Chaparral	Textura media	Compactado	Mixto	Madriguera asociada a una planta	Pino salado
RC7	32.475536	-116.687198	20.83	1.8	Chaparral	Textura gruesa	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	<i>Artemisa californica</i>
RC8	32.476517	-116.687718	23.7	1.7	Chaparral	Textura gruesa	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RC9	32.476622	-116.687821	-	1.6	Matorral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC10	32.476351	-116.687734	24.7	1.5	Chaparral	Textura media	Compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RC11	32.476298	-116.682585	24.9	1.1	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC12	32.476279	-116.68255	22.5	2.5	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RC13	32.476083	-116.682915	22.5	1.8	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC14	32.475929	-116.68295	25.1	1.9	Chaparral	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera sin cobertura o asociación	
RC15	32.475947	-116.682934	24.1	1.9	Chaparral	Textura	No compactado	Seco	Madriguera asociada	

						media			a una roca
RC16	32.475761	-116.682531	28.8	1.7	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación
RC17	32.475664	-116.682172	26.2	1.5	Chaparral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación
RC18	32.476003	-116.681331	26.8	1.4	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación

Anexo C

Tabla 11. Parámetros de los 12 puntos de muestreo de Rancho Golondrinas, Baja California.

Punto de muestreo	Coordenada Y	Coordenada X	Temperatura (°C)	Velocidad del viento (m/s)	Tipo de vegetación principal	Textura del suelo	Compactación del suelo	Condición de humedad observable	Lugar de obtención de la muestra	Especie
RG1	32.465793	-116.68204	28.2	1.5	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RG2	32.465785	-116.682082	27.3	1.6	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RG3	32.465234	-116.681333	26.7	1.9	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG4	32.464763	-116.679849	27.7	1.1	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG5	32.464642	-116.679718	27.5	1.1	Chaparral	Textura gruesa	Compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG6	32.460379	-116.682785	27.8	1.1	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG7	32.464159	-116.678712	26.7	1.1	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RG8	32.463982	-116.678179	26.1	1.2	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG9	32.464104	-116.678164	26.3	1.2	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
RG10	32.465277	-116.6814	25.7	3.3	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG11	32.464944	-116.68136	27.1	2.2	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
RG12	32.464944	-116.68136	26	2.6	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	

Anexo D

Tabla 12. Parámetros de los 26 puntos de muestreo de Rancho San José de la Zorra, Baja California.

Punto de muestreo	Coordenada Y	Coordenada X	Temperatura (°C)	Velocidad del viento (m/s)	Tipo de vegetación principal	Textura del suelo	Compactación del suelo	Condición de humedad observable	Lugar de obtención de la muestra	Especie
SJZ1	32.138007	-116.655619	23	3.4	Chaparral, ripario	Textura fina	Compactado	Mixto	No se obtiene de una madriguera	
SJZ2	32.137975	-116.655593	25.8	5.4	Chaparral, ripario	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera asociada a una planta	Encino
SJZ3	32.138612	-116.655464	-	5.4	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una roca	
SJZ4	32.138528	-116.655449	28.3	5.3	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ5	32.138469	-116.655361	28.3	1.9	Ripario	Textura media	No compactado	Húmedo	Madriguera asociada a una planta	<i>Baccharis</i>
SJZ6	32.138482	-116.655267	25	4.3	Ripario	Textura gruesa	No compactado	Húmedo	Madriguera asociada a una planta	Junco
SJZ7	32.138445	-116.655189	27.5	0	Ripario	Textura gruesa	No compactado	Mixto	Madriguera asociada a una planta	Encinos
SJZ8	32.138427	-116.655164	27.6	1.8	Ripario	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	Encinos
SJZ9	32.141355	-116.659275	29	3	Chaparral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	<i>Artemisa californica</i>
SJZ10	32.141314	-116.659248	28.7	2.5	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ11	32.141338	-116.659208	28.2	2.5	Chaparral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ12	32.14181	-116.659288	30	5	Chaparral	Textura gruesa	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	Salvia
SJZ13	32.179213	-116.686866	32.8	2.3	Ripario	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ14	32.179277	-116.68673	33	3	Matorral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ15	32.179064	-116.686415	33	2.5	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ16	32.179035	-116.686307	33.5	0	Ripario	Textura	No compactado	Mixto	Madriguera asociada	Encinos

						media			a una planta	
SJZ17	32.179077	-116.685921	29	0	Ripario	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera asociada a una planta	Encinos
SJZ18	32.179671	-116.6912	32.4	3	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	<i>Baccharis</i>
SJZ19	32.179647	-116.69119	32.5	2.8	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	<i>Baccharis</i>
SJZ20	32.179702	-116.691597	34	2	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ21	32.179655	-116.691837	33.8	2	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ22	32.179633	-116.691961	2.2	34	Chaparral	Textura media	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ23	32.175641	-116.697152	33	4.2	Ripario	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera sin cobertura o asociación	
SJZ24	32.175729	-116.697276	32	3	Ripario	Textura media	No compactado	Mixto	Madriguera asociada a una planta	Encinos
SJZ25	32.175201	-116.696922	33	2	Chaparral	Textura fina	No compactado	Seco	Madriguera asociada a una planta	Encinos
SJZ26	32.176192	-116.697234	32	2.5	Ripario	Textura media	No compactado	Húmedo	Madriguera asociada a una planta	Encinos base

Anexo E

Tabla 13. Tabla de datos sobre los resultados obtenidos de las muestras de suelo por ddPCR.

Muestra	Concentración (copias/ μ L)	Copias/20 μ Lpozo	Gotas aceptadas	Positivas	Negativas	Threshold
NTC 1	0.0663	1.33	17746	1	17745	10,637.00
NTC 2	0.000	0.00	17511	0	17511	10,637.00
NTC 3	0.000	0.00	17781	0	17781	10,637.00
Asp. 1	0.000	0.00	17188	0	17188	10,637.00
Asp. 2	0.000	0.00	17084	0	17084	10,637.00
VDP1	16.633	332.67	16953	238	16715	10,637.00
VDP2	0.143	2.86	16472	2	16470	10,637.00
VDP3	1.566	31.31	13535	18	13517	10,637.00
VDP4	0.103	2.05	11462	1	11461	10,637.00
VDP5	0.793	15.86	11872	8	11864	10,637.00
VDP6	0.919	18.38	11527	9	11518	10,637.00
VDP7	1.039	20.77	10200	9	10191	10,637.00
VDP8	0.105	2.10	11229	1	11228	10,637.00
VDP9	0.558	11.16	10549	5	10544	10,637.00
VDP10	3.385	67.69	11835	34	11801	10,637.00
VDP11	0.106	2.12	11118	1	11117	10,637.00
VDP12	0.000	0.00	16994	0	16994	10,637.00
VDP13	0.504	10.08	18673	8	18665	10,637.00
VDP14	0.275	5.50	17126	4	17122	10,637.00
VDP15	0.863	17.26	17730	13	17717	10,637.00
VDP16	0.326	6.52	18059	5	18054	10,637.00
VDP17	0.598	11.96	15743	8	15735	10,637.00
VDP18	1.481	29.61	17493	22	17471	10,637.00
VDP19	2.070	41.39	15361	27	15334	10,637.00
VDP20	1.083	21.66	16304	15	16289	10,637.00
C+ (1/10)	242.822	4,856.44	17781	3316	14465	10,637.00

NTC 1	1.51	30.12	13290	17	13273	8,722.15
NTC 2	0.28	5.63	12532	3	12529	8,722.15
NTC 3	0.17	3.47	13551	2	13549	8,722.15
Asp. 1	1.28	25.70	14657	16	14641	8,722.15
Asp. 2	0.72	14.34	6566	4	6562	8,722.15
RC1	0.34	6.87	13710	4	13706	8,722.15
RC2	0.09	1.75	13477	1	13476	8,722.15
RC3	0.18	3.59	13116	2	13114	8,722.15
RC4	0.18	3.53	13341	2	13339	8,722.15
RC5	0.43	8.60	16424	6	16418	8,722.15
RC6	0.11	2.21	21292	2	21290	8,722.15
RC7	0.18	3.55	13257	2	13255	8,722.15
RC8	20.76	415.13	12351	216	12135	8,722.15
RC9	0.87	17.42	12160	9	12151	8,722.15
RC10	0.83	16.51	14258	10	14248	8,722.15
RC11	0.00	0.00	13819	0	13819	8,722.15
RC12	0.38	7.55	12470	4	12466	8,722.15
RC13	0.45	8.99	13090	5	13085	8,722.15
RC14	1.14	22.77	11371	11	11360	8,722.15
RC15	0.09	1.74	13500	1	13499	8,722.15
RC16	0.00	0.00	11091	0	11091	8,722.15
RC17	0.10	1.94	12106	1	12105	8,722.15
RC18	0.61	12.12	13592	7	13585	8,722.15
RG1	0.17	3.44	13680	2	13678	8,722.15
RG2	0.10	1.98	11864	1	11863	8,722.15
RG3	0.23	4.58	10280	2	10278	8,722.15
RG4	3.70	73.92	11796	37	11759	8,722.15
RG5	0.00	0.00	12922	0	12922	8,722.15
RG6	0.00	0.00	12298	0	12298	8,722.15
RG7	0.18	3.63	12968	2	12966	8,722.15
RG8	0.08	1.69	13945	1	13944	8,722.15

RG9	0.18	3.55	13254	2	13252	8,722.15
RG10	0.53	10.57	13365	6	13359	8,722.15
RG11	0.38	7.55	12476	4	12472	8,722.15
RG12	0.19	3.85	12218	2	12216	8,722.15
SJZ1	0.00	0.00	11536	0	11536	8,722.15
SJZ2	0.51	10.28	13731	6	13725	8,722.15
SJZ3	0.49	9.89	14279	6	14273	8,722.15
SJZ4	0.09	1.80	13074	1	13073	8,722.15
SJZ5	0.23	4.50	10448	2	10446	8,722.15
SJZ6	11.88	237.61	10749	108	10641	8,722.15
SJZ7	0.19	3.86	12196	2	12194	8,722.15
SJZ8	0.83	16.61	14168	10	14158	8,722.15
SJZ9	0.26	5.12	13779	3	13776	8,722.15
SJZ10	0.00	0.00	13393	0	13393	8,722.15
SJZ11	0.09	1.89	12451	1	12450	8,722.15
SJZ12	0.00	0.00	13547	0	13547	8,722.15
SJZ13	0.10	1.98	11908	1	11907	8,722.15
SJZ14	0.27	5.36	13180	3	13177	8,722.15
SJZ15	0.09	1.80	13039	1	13038	8,722.15
SJZ16	0.08	1.70	13859	1	13858	8,722.15
SJZ17	0.00	0.00	13544	0	13544	8,722.15
SJZ18	0.00	0.00	13335	0	13335	8,722.15
SJZ19	0.09	1.83	12884	1	12883	8,722.15
SJZ20	0.40	7.95	11846	4	11842	8,722.15
SJZ21	0.08	1.69	13925	1	13924	8,722.15
SJZ22	0.65	13.01	14467	8	14459	8,722.15
SJZ23	0.17	3.34	14085	2	14083	8,722.15
SJZ24	1.43	28.69	13131	16	13115	8,722.15
SJZ25	0.81	16.26	13031	9	13022	8,722.15
SJZ26	0.19	3.80	12369	2	12367	8,722.15
C+ (1/10)	270.61	5,412.29	11889	2443	9446	8,722.15

