

Artículo original

Ecología de la coccidioidomicosis en el municipio Falcón de la Península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela

Dilia Martínez Méndez^{a,*}, Rosaura Hernández Valles^b

^aMicrobiología. Área Ciencias de la Salud. Programa de Medicina. ^bLaboratorio de Micología. CIB-UNEFM.

Recibido 25 de octubre de 2010; aceptado 22 de noviembre de 2010

Resumen: Se estudiaron las características ecoambientales de poblaciones del municipio Falcón de la Península de Paraguaná, y se cultivaron muestras de suelo para identificación de los aislados sugestivos de *Coccidioides* spp., mediante examen directo de las muestras de tejido de ratones inoculados con el hongo. Las características ecoambientales del municipio y el análisis químico del suelo favorecen la presencia del hongo en esta zona. Del cultivo de suelos se obtuvo un aislado sugestivo de *Coccidioides* spp., pero el estudio en animales de experimentación no reveló la formación de esférulas. Se confirmó la existencia de un área de riesgo para la coccidioidomicosis en la Península de Paraguaná.

Palabras clave: Coccidioidomicosis, ecoepidemiología, *Coccidioides* spp

Ecology of coccidioidomycosis at the Falcon municipality of Paraguana Peninsula, Falcon State, Venezuela

Abstract: The eco-environmental characteristics of populations from the Falcon Municipality of the Paraguana Peninsula were studied, and soil samples were taken for identification of isolates suggestive of *Coccidioides* spp., through direct exam of tissue samples from mice infected with this fungus. The eco-environmental characteristics of the municipality and the chemical analysis of the soil favor the presence of this fungus in this zone. From the soil sample cultures we obtained an isolate suggestive of *Coccidioides* spp, but the experimental animal study did not reveal spherule formation. The existence of a Coccidioidomycosis risk area at the Paraguana Peninsula was confirmed.

Keywords: Coccidioidomycosis, eco-epidemiology, *Coccidioides* spp

* Correspondencia:
E-mail: dmartinezmendez@hotmail.com

Introducción

Las condiciones eco-ambientales constituyen uno de los principales factores relacionados con la aparición de casos de coccidioidomicosis (CDM) [1,2]. Las áreas endémicas son regiones con prevalencia superior al 5%, donde se aísla el agente causal en el ambiente. Son zonas semidesérticas caracterizadas por climas áridos, secos, de veranos muy calurosos e inviernos suaves, baja altitud, vegetación xerófila, suelos arenosos con elevadas concentraciones de sales y pH alcalino (favorables para el crecimiento de *Coccidioides* spp.), con menos de 800 mm anuales de lluvia que se pierde por escurrimiento y evaporación, haciendo que la capa superficial del suelo se vuelva polvo, de fácil desplazamiento por las corrientes de

aire [3-7]. *Coccidioides* spp. sobrevive en estos suelos a altas temperaturas, creciendo en forma de micelio que se fragmenta con facilidad, dispersando las artroconidias a varios kilómetros de distancia, como consecuencia de los vientos o del movimiento de la tierra por acción del hombre (construcción, arqueología, deforestación) [1,7-9].

La importancia epidemiológica de la CDM ha sido ampliamente estudiada en México y Estados Unidos, estableciéndose la relación entre las características ecológicas y el reporte de casos, pero a pesar de que éstos se han incrementado en los últimos años, son pocos los aislamientos obtenidos del ambiente. Esta baja correlación entre los datos epidemiológicos y ambientales pudiera deberse a una falta de caracterización del nicho ecológico de *Coccidioides* spp., que incluye un amplio rango de

condiciones ambientales favorables para la existencia del hongo. En Venezuela, la CDM ha sido reportada desde 1948 en estados de clima seco, por lo que el Dr. Dante Borelli circunscribió la zona endémica a los estados Lara, Zulia y Falcón, en donde se han reportado la mayoría de los casos en el país [9,10]. Hasta la fecha, se han reportado 113 casos en Venezuela, de los cuales 28 (25%) provienen de la zona árida del noroccidente del estado Falcón, incluyendo la Península de Paraguaná [10-15].

El objetivo del presente estudio fue evaluar las características ecoambientales que favorecen la presencia de *Coccidioides* spp., en poblaciones del municipio Falcón de la Península de Paraguaná, estado Falcón, con la finalidad de aportar datos sobre las características climáticas de la zona y su posible relación con la presencia de la forma saprófita del hongo.

Materiales y métodos

Se realizó una investigación de tipo descriptivo, prospectivo y transversal de las características ecoambientales que pudieran favorecer la presencia de este hongo en poblaciones del municipio Falcón, Península de Paraguaná, estado Falcón.

Estudio de las características ambientales: Las características ambientales de temperatura y velocidad de los vientos se determinaron mediante la utilización de un sistema de posicionamiento global (GPS Garmin® Modelo E-trex) y la información sobre el índice de precipitación se extrajo del boletín climatológico del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, emitido en el mes de noviembre de 2009, correspondiente al mes de obtención de las muestras. La evaluación de la salinidad, pH y conductividad eléctrica fue realizada en el laboratorio de suelos del Departamento de Desarrollo y Producción Agrícola, Programa de Química, Área de Ciencias del Agro y Mar, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Para analizar las características climáticas de las poblaciones en estudios se realizó el cálculo del promedio de la temperatura, velocidad de los vientos y precipitación anual.

Estudio de suelo: Se colectaron 10 muestras de suelo, seleccionadas tomando en cuenta la procedencia de los pacientes que resultaron positivos a la prueba de intradermoreacción (detectados en los estudios previamente citados), en las poblaciones del municipio Falcón: Moruy, Buena Vista, Adaure, Pueblo Nuevo, El Hato y Adícora. Estas muestras fueron obtenidas hasta los 20 cm de profundidad y se procesaron por duplicado empleando dos metodologías in vitro [16,17], utilizando dos medios de cultivo: agar Sabouraud con cloranfenicol (HiMEDIA M1067) y agar extracto de levadura (HiMEDIA RM027). Se prepararon suspensiones con agua destilada estéril a las diluciones 1:10 y 5:10 peso/volumen de cada muestra de tierra conteniendo 10mg/mL de volumen final de cloranfenicol, agitándolas en un agitador vortex durante 10 minutos. El sobrenadante se

utilizó para la siembra siguiendo la siguiente metodología:

a) Test de suspensión de tierra en placas: se agregaron 100 µL de cada suspensión, diseminándolas por estrías con asa de vidrio sobre el medio de cultivo ya solidificado.

b) Vertido en placa: al medio de cultivo sin solidificar se le agregó el sobrenadante mezclando por inversión, depositándolo posteriormente en placas estériles a temperatura ambiente para su solidificación. Una vez transcurridos 15 días de incubación, se describieron las características macroscópicas de las colonias aisladas y se visualizaron microscópicamente las colonias sugestivas de *Coccidioides* spp.

Aislamiento ambiental de Coccidioides spp.: Del crecimiento micelial del hongo aislado del estudio de suelos y de la cepa control, se diluyó suficiente raspado en 5 mL de solución salina estéril al 0,9%, ajustando la concentración a la turbidez equivalente al patrón Mc Farland N° 2 (6×10^8 UFC/mL). Con la finalidad de observar el dimorfismo de los aislados sugestivos de *Coccidioides* spp., se inoculó por vía intraperitoneal un volumen de 0,1mL de cada preparado en ratones Balb/c machos adultos, con peso aproximado de 20 ± 5 gramos, donados por el Instituto de Biomedicina (IBM), adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud. Los ratones fueron distribuidos en 3 grupos de 10 ratones cada uno: un grupo para la inoculación con el aislado sugestivo, un grupo como control positivo (inoculado con la cepa de *Coccidioides* spp. 4545 del IBM) y un grupo control sano. A los 15 días se sacrificaron y se extrajeron pulmones, hígado y bazo, según metodología previamente descrita [16]. Los animales fueron manipulados de acuerdo con lo establecido en el documento para el Uso de Animales en la Investigación Biomédica, adoptado por la Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, celebrada en Pilanesberg, Sudáfrica, en octubre de 2006, según consta en Acta N° 135.01.2010.01 del Comité de Bioética de la UNEFM [18].

Resultados

Para la descripción de las características ecoambientales, se seleccionaron las 6 poblaciones más habitadas del municipio Falcón: Moruy, Buena Vista, Adaure, Pueblo Nuevo, El Hato y Adícora. La ubicación geográfica y las características ambientales para noviembre de 2009, se describen en la tabla 1. El rango de la velocidad del viento osciló entre 12,7 – 16,1 Km/h, con un promedio de 14,4 Km/h; la temperatura ambiental se mantuvo entre 27,8 - 32,7 °C, con un promedio de 31°C; la humedad relativa osciló entre 61,7 – 72% con un promedio de 70,2%, y el estimado mensual de precipitación fue de 24,3 mm.

Las precipitaciones durante noviembre de 2009 registraron valores por debajo del promedio normal en casi la totalidad del territorio nacional. El comportamiento de la precipitación en la región Centro Occidental (Yaracuy, Lara y Falcón), mantuvo una variación porcentual por debajo de lo esperado, desde un 4% en Barquisimeto (48,4 mm) hasta

53% en la ciudad de Coro (24,3 mm) [19]. Esto indica que en ese mes hubo temporada de sequía en la zona evaluada. El análisis químico de las muestras de suelo se describe en la tabla 2.

Para el aislamiento de *Coccidioides* spp., las muestras de suelo fueron procesadas por duplicado utilizando la siembra por agotamiento y el doble vertido en placa, evidenciándose mejor crecimiento y recuperación de colonias con el método de doble vertido en placa, a la dilución 1:10 tratadas con cloranfenicol. En todas las placas inoculadas se observó el crecimiento de varias colonias fúngicas, pero sólo las colonias que poseían características macroscópicas similares a *Coccidioides* spp., tales como: colonias blancas, algodonosas, cerebriiformes en el anverso y color crema en el reverso, fueron repicadas en agar Sabouraud con cloranfenicol y agar extracto de levadura. Se aislaron 10 colonias que poseían las características macroscópicas descritas; a estas se les realizó estudio microscópico entre lámina y laminilla con Azul de Lactofenol®, evidenciándose en una muestra recolectada en la población de Adaure, estructuras similares a las artroconidias de *Coccidioides* spp., [20] (Figura 1). En el resto de los aislados se visualizaron

estructuras de fructificación diversas, no compatibles con artroconidias.

El aislado sugestivo de *Coccidioides* spp. fue nuevamente aislado en agar Sabouraud con cloranfenicol y agar extracto de levadura, hasta obtener un cultivo puro, que se denominó cepa M5c. Para evidenciar la presencia de esférulas, se inocularon 10 ratones con la cepa *Coccidioides* spp. N° 4545 del IBM (grupo control positivo), 10 con la cepa M5c (cepa en estudio) y 10 no fueron inoculados (grupo control sano). En los ratones del grupo control positivo se observó el fallecimiento de uno al día 10 y otro al día 14 posterior a la inoculación. En el pulmón, hígado y bazo de los ratones del grupo control positivo, se visualizaron esférulas al estudio microscópico con KOH al 10%. En los ratones inoculados con la cepa M5c no se visualizaron esférulas en los órganos extraídos, lo que sugiere que a pesar de que las características morfológicas del aislado se asemejan a la cepa control, el comportamiento *in vivo* es diferente; por lo tanto, este aislado pudiera tratarse de una especie distinta a *Coccidioides* spp. o una variante genética poco virulenta de este hongo.

Tabla 1. Características ambientales de las poblaciones donde se colectaron las muestras de suelo. Municipio Falcón, Península de Paraguaná, estado Falcón. Venezuela. 2010.

Muestra/Población	Ubicación geográfica y características ambientales						
	Latitud	Longitud	Velocidad del viento (K.m/h)	Altitud (m.s.n.m)	Temperatura (°C)	Humedad relativa	Hora
1 - Moruy	N 11°25'178"	O 69°57'076"	16,1	121	32,1	61,7%	10:31 am
2 - Buena Vista	N 11°34'298"	O 69°56'123"	13,6	119	32,1	61,7%	10:31 am
3, 4, 5 - Adaure	N 11°52'298"	O 69°59'276"	15,6	114	32,1	61,7%	10:31 am
6, 7, 8 - Pueblo Nuevo	N 11°56'876"	O 69°55'285"	13,5	72	27,8	64,9%	11:46 am
9 - El Hato	N 11°56'947"	O 69°54'834"	12,7	45	32,7	72%	12:13 pm
10 - Adícora	N 11°56'530"	O 69°48'183"	14,6	0	28,8	65%	12.43pm

Tabla 2. Características químicas de las muestras de suelo colectadas en poblaciones del municipio Falcón, Península de Paraguaná, estado Falcón. Venezuela. 2010.

Muestra	Cationes (mEq/L)					Aniones (mEq/L)				pH	CE (dS/m)
	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Total	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁼	Total		
M 1	1.9	0.82	0.04	0.04	2.8	0.04	2.32	0.38	2.74	6.1	2.6
M 2	1.7	1.9	0.05	0.3	3.95	0.05	2.28	0.84	3.17	7.01	4.3
M 3	1.04	0.72	0.05	0.16	1.97	0.06	1.4	0.76	2.22	8.11	3.1
M 4	0.66	0.04	0.14	0.15	0.99	0.04	0.64	0.26	0.94	7.3	2.5
M 5	0.52	0.5	0.02	0.06	1.1	0.06	0.72	0.2	0.98	7.6	1.5
M 8	0.45	0.66	0.03	0.06	1.2	0.04	0.72	0.26	1.02	7.5	1.9
M 9	0.24	0.16	0.01	0.04	0.45	0.07	0.12	0.28	0.47	7.8	0.75

M: Muestra; meq/L: miliequivalente/litro; Ca: calcio; Mg: magnesio; Na: sodio; K: potasio; HCO₃⁻: bicarbonato; Cl: cloro; SO₄⁼: sulfato; CE: conductividad eléctrica; dS/m= deciSiemens/metro.

Fuente: Laboratorio de Suelos, Departamento de Desarrollo y Producción Agrícola y Programa de Química, Área Ciencias del Agro y Mar. UNEFM.

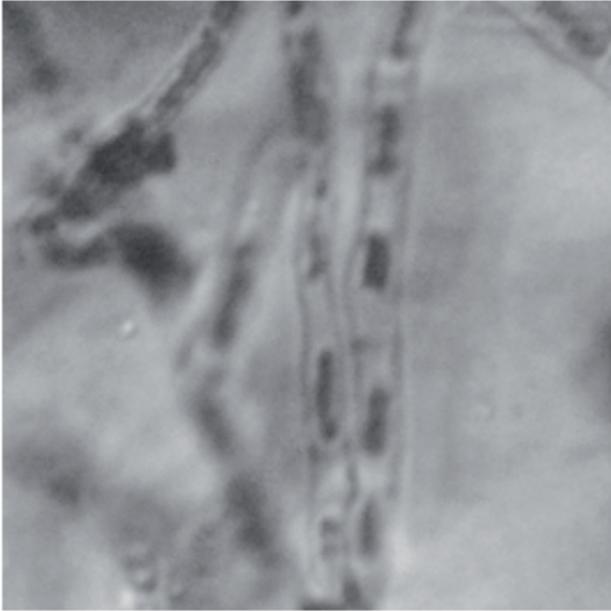


Figura 1. Visualización microscópica del aislado M5c. Examen directo con Azul de Lactofenol® (Aumento 400X)

Discusión

Varios autores han establecido la estrecha relación que existe entre la mayor incidencia de casos de CDM y los eventos climáticos y meteorológicos, en donde los meses con mayor número de pacientes corresponden a los meses más secos del año, precedidos de lluvias estacionales [1,21-26]. Egeberg *et al.*, estudiaron durante 8 años 6 acres (3,23 hectáreas) de tierra en un área endémica del estado de California (USA), y concluyeron que la mayor tasa de recuperación de *Coccidioides* spp. se produjo durante la primavera de los años en donde la concentración de sales es mayor, facilitando el crecimiento del mismo por la inhibición de saprófitos no tolerantes a las altas concentraciones de sal [27]. Sin embargo, el porcentaje de recuperación de *Coccidioides* spp. a partir de muestras de tierra es apenas de 1 a 2% [16]. En este estudio, la recolección de muestras de tierra coincidió con un período de sequía y la tierra de donde se obtuvo el aislado mostró una salinidad normal que quizás influyó en la ausencia de aislamiento de *Coccidioides* spp. Por otra parte, como este hongo se recupera de tierras altamente salinas, pudiera sugerirse la posibilidad de utilizar medios de cultivo con altas concentraciones de sal que disminuyan el crecimiento de microorganismos competitivos y favorezcan el crecimiento de *Coccidioides* spp. como una variable a tomar en cuenta para futuros estudios, al igual que se recomienda el tratamiento del sobrenadante con antibióticos y el método de vertido en placa como los más favorables para el aislamiento de las colonias, debido a que se recuperan con mayor facilidad [4, 27-29].

El estudio en ratones inoculados con la cepa M5c no evidenció la formación de esférulas, transformación *in vivo* característica del dimorfismo del *Coccidioides* spp. A pesar de que esta cepa presentó las características morfológicas tanto macroscópicas (colonias blancas, algodonosas,

cerebriformes en el anverso y color crema en el reverso, en agar Sabouraud con cloranfenicol) como microscópicas (estructuras similares a artroconidias, de paredes delgadas, con disyuntores o “células fantasma” intercaladas) que pudieran considerarse en la variabilidad natural del *Coccidioides* spp. descrita por Hupper [20], hay que tomar en cuenta que otros hongos producen artroconidias, como por ejemplo, *Malbranchea* spp., *Geotrichum candidum*, y hongos de la familia *Gymnoascaceae*, pero sólo *Coccidioides* spp. produce esférulas en animales infectados. Aún así, se considera importante la identificación genética de la cepa M5c mediante amplificación del ADN e hibridación con sondas específicas de *Coccidioides* spp. para identificar genéticamente el aislado [30].

Las causas de la ausencia de aislamiento de *Coccidioides* spp. en las muestras de tierra en este estudio, pudieran deberse a: 1) salinidad del suelo normal o ligeramente salino, lo que favorece el crecimiento de microorganismos que compiten con *Coccidioides* spp. por el sustrato, inhibiendo su crecimiento; 2) las muestras de tierra no se recolectaron de los bordes de madrigueras sino de lugares de paso peatonal seleccionados al azar en las poblaciones donde residían los individuos con IDR positiva; 3) en los días previos y el día de la recolección de las muestras hubo lloviznas dispersas en toda la Península de Paraguaná, disminuyendo la capacidad de las artrosporas mojadas para dispersarse por el medio ambiente, y 4) el número de muestras recolectadas. Por ello se insiste en la necesidad de continuar la búsqueda de este hongo en el medio ambiente, recolectando también muestras de madrigueras, con la finalidad de evaluar las condiciones ecológicas y bioclimáticas que puedan favorecer la presencia de un nicho ecológico para *Coccidioides* spp., ya que el estudio científico y continuo de la biodiversidad fúngica en estos microambientes es escasa o inexplorada.

Por último, los casos de CDM procedentes de la Península de Paraguaná y los estudios inmunoepidemiológicos reportados en la zona sugieren que allí existe un área de riesgo para contraer la CDM, por lo que esta enfermedad debe ser descartada en todo paciente con síntomas respiratorios y/o lesiones ulcerosas en la piel que vivan en la zona o que informen haberse desplazado hacia ella [10-15].

Agradecimientos

Para la culminación de éste estudio se agradece especialmente a la Sra. Zaida Bracho y la Sra. Margot Colina, la Dra. Maigualida Pérez, a todo el personal del Ambulatorio Urbano II Simón Bolívar de Pueblo Nuevo de Paraguaná, al Dr. Manuel Díaz, la Dra. Mireya Mendoza y al Sr. Luna del IBM y a Kristina Gómez Pereira por su colaboración en la elaboración del manuscrito.

Parcialmente financiado por FUNDACITE-Falcón resolución N° 0565.

Referencias

1. Comrie AC. Climate factors influencing Coccidioidomycosis

- seasonality and outbreaks. Environ Health Perspect. 2005; 113: 688-92.
2. Baptista-Rosas RC. Assessing the impact of global climate change on the borderlands: the case of valley fever. Border Climate Summary. 2009; 6: 1-4. Disponible en: http://www.climas.arizona.edu/files/climas/pdfs/periodicals/BorderClimateSummary_Apr09.pdf. Acceso: 02 de agosto de 2010.
 3. Laniado R, Cárdenas R, Álvarez M. Tijuana: zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. Salud Pub Mex. 1991; 33: 235-9.
 4. Elconin A, Egeberg R, Egerberg M. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. J Bacteriol. 1964; 87: 500-3.
 5. Mondragón-González R, Méndez-Tovar LJ, Bernal-Vázquez E, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Ríos Rosas C, Contreras-Pérez C, Anides-Fonseca AE. Detección de infección por *Coccidioides immitis* en zonas del estado de Coahuila, México. Rev Arg Microbiol. 2005; 31: 135-8.
 6. Hector RF, Laniado-Laborin R. Coccidioidomycosis – A fungal disease of the Américas. PLoS Med. 2005; 2: 15-8.
 7. Albornoz MC. Coccidioidomycosis. En: Bastardo de Albornoz MC, editora. Temas de Micología Médica, 1ª edición. 1996. pp. 221-34.
 8. Borelli D, Pérez M, Molina T. Coccidioidomycosis: un caso más en el bosque muy seco tropical. Derm Venez. 1991; 29: 119-23.
 9. Baptista-Rosas R, Hinojosa A, Riquelme M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. Ann NY Acad Sci. 2007; 1111: 35-46.
 10. Campins H. Coccidioidomycosis in Venezuela. En: Libero Ajello, editor. Coccidioidomycosis, 1ª edición. The University of Arizona Press. 1967. pp. 279-85.
 11. Grupos de Trabajo en Micología. Casuística de las Micosis Profundas. Compilación 24 años de historia 1984-2008. Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela. 2009; 42: 10.
 12. Pollack, L. Histoplasmosis en Venezuela. Ensayo Epidemiológico. Act Med Venez. 1953; 1: 150-2.
 13. Zirit R, Graterol C, Borelli D. Coccidioidomycosis. Comprobación de la endemia en el Estado Falcón, Venezuela y relato de un caso. Dermatol Venez. 1959; 1: 308-24.
 14. Quintero MA, Padilla R, Laguna X, Sanchez-Mirt A, Mirt JA. Estudio inmuno-epidemiológico y radiológico de la Coccidioidomycosis en los habitantes de Pueblo Nuevo (Paraguaná, edo. Falcón). Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela. 1987; 9: 11-2.
 15. Mirt JA, Sánchez-Mirt A. Coccidioidomycosis: siete casos en el estado Falcón, Venezuela. Invest Clin. 1988; 29: 71-8.
 16. Cordeiro RA, Brillhante RSN, Rocha MFG, Fehine MAB, Camara LMC, Camargo ZP, Sidrim JJC. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. Med Mycol. 2006; 44: 631-9.
 17. Omieczynki DT, Sawtek FE. The comparison of two methods for the direct isolation of *Coccidioides immitis* from soil using three different media. En: Libero Ajello, ed. Coccidioidomycosis. The University of Arizona Press. 1967. pp. 279-85.
 18. Asociación Médica Mundial. Disponible en: <http://www.wma.net/s/policy/a18.htm> Acceso: 8 de septiembre de 2009.
 19. Boletín Climatológico Mensual. Noviembre 2009. Disponible en: <http://www.inameh.gob.ve/web/index.php>. Acceso: 2 de agosto de 2010.
 20. Huppert M, Sun S, Bailey J. Natural variability in *Coccidioides immitis*. En: Libero Ajello, ed. Coccidioidomycosis. The University of Arizona Press. 1967. pp 323-8.
 21. Padua GA, Martínez-Ordaz VA, Velazco-Rodríguez VA, Lazo-Sáenz JG, Cícero R. Prevalence of skin reactivity to coccidioidin and associated risk in subjects living in a northern city in Mexico. Arch Med Res. 1999; 30: 388-92.
 22. Kolivras K, Johnson P, Comrie A, Yool S. Environmental variability and coccidioidomycosis (Valley fever). Aerobiología. 2001; 17: 31-42.
 23. Kolivras K, Comrie A. Modeling valley fever (coccidioidomycosis) incidence on the basis of climate conditions. Int J Biometeorol. 2003; 47: 87-101.
 24. Park B, Sigel K, Vaz V, Komatsu K, McRill C, Phelan M, Colman T, Comrie A, Warnock W, Galgiani J, Hajjeh R. An epidemic of Coccidioidomycosis in Arizona associated with climatic changes, 1998-2001. J Infect Dis. 2005; 191: 1981-7.
 25. Zender C, Talamantes J. Climate control in valley fever in Kern County California. Int J Biometeorol. 2006; 50: 1974-82.
 26. Baptista-Rosas R, Arellano E, Hinojosa A, Riquelme M. Bioclimatología de la Coccidioidomycosis en Baja California, México. Invest Geograf. 2010; 71: 21-30.
 27. Egeberg R, Elconin A, Egerberg M. Effect of salinity and temperature on *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. J Bacteriol. 1964; 88: 473-6.
 28. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. Nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. Mycologia, 2002; 94: 73-84.
 29. Lacy G, Swatek F. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian middens in California. Appl Microbiol. 1974; 27: 379-88.
 30. Lindsley M, Hurst S, Iqbal N, Morrison Ch. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J Clin Microbiol. 2001; 10: 3505-11.