

Detection of *anti-Coccidioides immitis* antibodies in the serum of small wild mammals in a locality of the Potosino Plateau

Detección de anticuerpos *anti-Coccidioides immitis* en suero de pequeños mamíferos silvestres en una localidad del Altiplano Potosino

Leonel Rivera-Ovalle¹; Xochil Vega-Manriquez¹; César Posadas-Leal¹; Rosa Santos-Díaz¹; José Rangel-Flores¹; Paola Carreón-Lizcano¹; Miranda Lobo-Martínez¹; Agustín Noriega-López¹; Laura Castañón-Olivares²; Carolina Segundo-Zaragoza³

¹Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria, carretera San Luis-Matehuala km 14.5, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, S. L. P. C. P. 78321.

²Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina, Circuito Escolar núm. 411^a, Copilco Universidad, Coyoacán, Ciudad de México. C. P. 04360.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción animal en Altiplano (CEIEPAA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Carretera Federal Tequisquiapan a Ezequiel Montes km 8.5, Tequisquiapan, Qro. C. P. 76790.

*Corresponding author: c_segund@yahoo.com.mx, Tel: 414 2918100.

Abstract

Historical evidence regarding coccidioidomycosis in Mexico refers to a disease with a defined distribution at the northern border of the country. However, despite the endemism indicated in the Mexican territory, as well as in the United States of America, information concerning this situation in Mexico is scarce. This research is indicated as the first Mexican report to determine antibodies against *Coccidioides immitis* in serum of small wild mammals in a region of the Potosino Plateau. In the municipality of Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, Mexico, 54 samples from small mammals were taken: *Didelphis virginiana*, *Sciurus oculatus*, *Otospermophilus variegatus*, *Rattus norvegicus*, and *Neotoma* sp. through the double agar immunodiffusion technique, *anti-Coccidioides immitis* antibodies were detected in 42.5% (23/54) of the study samples. These results allow to suggest that the fauna and the environment present favorable conditions for the fungus to develop its biological cycle in the area. This study support basis for future research on this fungal organism in relation to its adaptation to different natural environments.

Key words:

Coccidioidomycosis, wildlife, Valley Fever, habitat

Resumen

La evidencia histórica con respecto a la coccidioidomycosis en México refiere a una enfermedad con distribución definida en la frontera norte del país. Sin embargo, pese al endemismo señalado en el territorio mexicano, así como en Estados Unidos de América, la información con respecto a esta situación en México es escasa. Esta investigación se señala como el primer informe mexicano sobre la determinación de anticuerpos contra *Coccidioides immitis* en suero de pequeños mamíferos de carácter silvestre en una región del Altiplano Potosino. En el municipio de Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México, se muestrearon 54 mamíferos de talla pequeña: *Didelphis virginiana*, *Sciurus oculatus*, *Otospermophilus variegatus*, *Rattus norvegicus* y *Neotoma* sp. mediante la técnica de inmunodifusión doble en agar, se detectaron anticuerpos *anti-Coccidioides immitis* en 42.5 % (23/54) de las muestras. Ello permite proponer que la fauna y el ambiente presentan condiciones favorables para que el hongo desarrolle su ciclo biológico en la zona. Con este estudio se establecen bases para futuros análisis de este organismo fúngico en relación con su adaptación a diferentes entornos naturales.

Palabras clave:

Coccidioidomycosis, fauna silvestre, Fiebre del Valle, hábitat.



Introduction

The coccidioidomycosis or San Joaquín Valley Fever is an emerging disease caused by the fungus *Coccidioides immitis*. Positive cases have been detected in the California's Central Valley, in Southern California and in West Texas, these states are considered as endemic for the disease (Fisher et al., 2007). Due to the meaning of the disease in California and Arizona, a follow-up program for the infection was developed by the 'Centers for Disease Control and Prevention' (CDC) (Kollath, et al., 2019). In regions of Paraguay, Colombia, Guatemala, Honduras, Panamá, and Venezuela a great mycosis prevalence has been proved (Campins, 1970; Mayorga and Espinoza, 1970). In Mexico, data from 2019 personally informed by Dr Castañón to Dr Barker, shows a prevalence of 67 % in Sonora, 49.5 % in Coahuila, 39.8 % in Nuevo León and 37.5 % in Baja California (Barker, et al., 2019). However, existing, and complete epidemiological studies that describe the current situation of the disease in Mexico and regions of Central America and South America, are scarce (Barker et al., 2019; Kollath et al., 2019).

The coccidioidomycosis affects the human population, as well as a great diversity of animal species among them, rodents, dogs, cats, equines, cattle, llamas, monkeys, and marine mammals such as seals and sea otters (Reyes-Montes et al., 2016). In human beings, the clinical manifestations of the disease are mainly presented with respiratory and pneumonia symptoms that are usually self-limiting (Valdivia et al., 2006). These symptoms can be worse with the formation of residual granuloma, and, in immunocompromised specimens, the disease can spread (Rodríguez-Cerdeira et al., 2014). A significant percentage (50-70 %) of specimens infected do not develop symptoms (Nguyen et al., 2013). Due to problems in diagnosis and treatment, the disease can progress and trigger the death (Kollath et al., 2019).

Coccidioides immitis is a dimorphic fungus with mycelial phase composed of arthroconidia found in the soil, and generally enters the host by the airway (Guevara-Olvera, et al., 2000). There, spherule is differentiated, this is the yeast phase and, it occurs when this mature structure releases endospores that at the same time can create new spherules and continue the cycle in the host as an intracellular pathogen in different tissues (Kollath et al., 2019). Since the middle of the last century, the results allowed to make the hypothesis that proposes the formation of endozoans that would be spherules able to survive within the granuloma of wild mammals, without inducing the disease but that would have an important participation in the fungus cycle and its dissemination (Taylor y Baker, 2019). When the host dies, the spherule would release from the granuloma and would have direct access to organic matter, this is the corpse that houses it because it has

Introducción

La coccidioidomycosis o fiebre del Valle de San Joaquín es una enfermedad emergente ocasionada por el hongo *Coccidioides immitis*. Casos positivos se han detectado en el Valle Central de California, el sur de Arizona y el oeste de Texas; esos estados son considerados como endémicos de la enfermedad (Fisher et al., 2007). Debido a la importancia de la enfermedad en California y Arizona se implementó un programa de seguimiento de la infección por parte del 'Centers for Disease Control and Prevention' (CDC) (Kollath, et al., 2019). En regiones de Paraguay, Colombia, Guatemala, Honduras, Panamá y Venezuela se ha corroborado una gran prevalencia de la micosis (Campins, 1970; Mayorga y Espinoza, 1970). En México, datos de 2019 informados de manera personal por la Dra. Castañón al Dr. Barker indican una prevalencia de 67 % en Sonora, 49.5 % en Coahuila, 39.8 % en Nuevo León y 37.5 % en Baja California (Barker, et al., 2019). Sin embargo, estudios epidemiológicos completos y vigentes que describan la situación actual de la enfermedad en México y en regiones de América Central y América del Sur son escasos (Barker et al., 2019; Kollath et al., 2019).

La coccidioidomycosis afecta a la población humana, así como a una gran diversidad de especies animales entre ellos roedores, perros, gatos, equinos, bovinos, llamas, monos y mamíferos marinos como focas y nutrias marinas (Reyes-Montes et al., 2016). En los seres humanos, las manifestaciones clínicas de la enfermedad se presentan principalmente con cuadros respiratorios y neumónicos que suelen ser autolimitantes (Valdivia et al., 2006); dicho cuadro clínico se puede complicar con la formación de granulomas residuales y, en individuos inmunocomprometidos, la enfermedad se puede diseminar (Rodríguez-Cerdeira et al., 2014). Un porcentaje grande (50-70 %) de individuos infectados no desarrollan síntomas (Nguyen et al., 2013); debido a problemas en el diagnóstico y tratamiento, la enfermedad puede progresar y desencadenar la muerte (Kollath et al., 2019).

Coccidioides immitis es un hongo dimórfico con fase micelial conformada por arthroconidios que se encuentra en el suelo y penetra generalmente por la vía aérea al hospedero (Guevara-Olvera, et al., 2000). Ahí se diferencia a esférula, la fase levaduriforme y, cuando esta estructura madura libera endosporas que pueden a su vez formar esférulas nuevas y continuar el ciclo en el hospedero como patógeno intracelular o extracelular en diferentes tejidos (Kollath et al., 2019). Los resultados desde mediados del siglo pasado permitieron plantear la hipótesis que propone la formación de endozoos que serían esférulas capaces de sobrevivir dentro del granuloma de mamíferos silvestres, sin ocasionar la enfermedad pero que tendrían una participación importante en el ciclo del hongo y en su diseminación

enzymes that metabolize proteins from the animal cells. Then, the environmental conditions would be proper for the development of the mycelial phase of the fungus that would form the arthroconidia and, once they are in the environment, these can be inhaled by wild hosts and begin the cycle again (Taylor y Baker, 2019). The latest, strengthens the statement of the key role played by wild animals in the transmission of *C. immitis* to the environment due to the continuous interaction with its surrounding (Taylor y Baker, 2019; Reyes-Montes et al., 2016) and the behavior they show in the construction of burrows; also, the spread of the microorganism can be influenced by the migration of some mammals, including people (Reyes-Montes et al., 2016; Kirkland and Fierer, 2018).

In the environment, *C. immitis* presents an irregular distribution in the soils of the endemic regions in the American continent (Kollat et al., 2019). The existence of the fungus in the soil has been analyzed by looking for the association with abiotic factors such as the pH, electrical conductivity, texture, chemical composition, temperature, and humidity. The last one is a determinant factor because is related to warm temperatures, sandy soil, and alkaline pH with low conductivity (Barker et al., 2012). However, more research that allow to fully associate these environmental variables with the presence of the fungus in the soil, is necessary (Baker et al., 2012; Kollat et al., 2019). Apparently, the animal carcasses and the organic matter in the habitat, are related to the fungus development in the soil (Baker et al., 2019; Kollat et al., 2019; Kirkland and Fierer, 2018).

Studies developed in Baja California, Mexico, demonstrate the presence of *C. immitis* in the soil of wild animal burrows and that the existence of organic matter could favor the fungus development in the microhabitat (Vargas-Gastelum et al., 2015). The Potosino Plateau is not considered as endemic zone of the microorganism, however, an inform about a clinic case of meningeal coccidioidomycosis in a construction worker, is known (Matuk et al., 2014). In addition, the fact that the fungus geographical distribution has changed, must be considered, also, there is little or no information existent in our country regarding the presence of *C. immitis* in the environment of the non-endemic regions and it is unknown if the fungus exists in the soil of these regions. The place where the research was developed has a diversity of wild animals and based on their survival behavior, such as digging burrows, animals are in constant contact with the soil and with arthroconidia that can infect animal specimens. The objectives of the study were to detect antibodies against *Coccidioides immitis* in the serum of small wild animals through the double agar immunodiffusion technique, as well as to describe the characteristics about the habitat of these animals.

(Taylor y Baker, 2019). Al morir el hospedero, la esférula se liberaría del granuloma y tendría acceso directo a la materia orgánica que representa el cadáver que lo aloja gracias a que posee enzimas que metabolizan las proteínas de las células animales; posteriormente, las condiciones ambientales serían propicias para que se derive la fase micelial del hongo que formaría los arthroconidios y, una vez en el ambiente, estos pueden ser inhalados por hospederos silvestres y nuevamente comenzar el ciclo (Taylor y Baker, 2019). Lo anterior fortalece el planteamiento del papel importante que representan los animales silvestres en la transmisión de *C. immitis* al ambiente por la interacción continua con su entorno (Taylor y Baker, 2019; Reyes-Montes et al., 2016) y el comportamiento que presentan en la construcción de madrigueras; además, la dispersión del microorganismo puede ser influenciada por la migración de algunos mamíferos, incluso personas (Reyes-Montes et al., 2016; Kirkland y Fierer, 2018).

En el ambiente, *C. immitis* presenta una distribución irregular en los suelos de las regiones endémicas del continente americano (Kollat et al., 2019). La presencia del hongo en el suelo se ha estudiado buscando asociación con factores abióticos como pH, conductividad eléctrica, textura, composición química, temperatura y humedad; este último es un factor determinante debido a que está relacionado con temperaturas calientes, suelo arenoso y pH alcalino con poca conductividad (Barker et al., 2012). Sin embargo, más investigaciones que permitan asociar plenamente estas variables ambientales con la presencia del hongo en el suelo son necesarias (Baker et al., 2012; Kollat et al., 2019). Al parecer, los cadáveres de animales y la materia orgánica presente en el hábitat tienen una asociación con el desarrollo del hongo en el suelo (Baker et al., 2019; Kollat et al., 2019; Kirkland y Fierer, 2018).

Estudios realizados en Baja California, México, demuestran la presencia de *C. immitis* en el suelo de las madrigueras de animales silvestres y que la presencia de la materia orgánica podría estar favoreciendo el desarrollo del hongo en el microhábitat (Vargas-Gastelum et al., 2015). El Altiplano Potosino no es considerado como zona endémica del microorganismo; no obstante, un informe de un caso clínico de coccidioidomycosis meníngea en un trabajador de la construcción es conocido (Matuk et al., 2014). Aunado a lo anterior, el que la distribución geográfica del hongo ha cambiado, se debe considerar; además, poca o nula información en nuestro país existe con respecto a la presencia de *C. immitis* en el ambiente de las regiones consideradas como no endémicas y se desconoce si el hongo existe en el suelo de dichas regiones. El sitio donde se desarrolló la investigación aloja una diversidad de fauna silvestre y con base en su comportamiento de supervivencia, tal como escavar

Materials and methods

Study area

The sample collection was conducted in the *ejido* Palma de la Cruz, municipality of Soledad de Graciano Sánchez in the state of San Luis Potosí, Mexico. The study area is at an average altitude of 1 834 meters above sea level, with a vegetation type corresponding to an unarmed *parvifolio*, *rosetophyll* and *izotal* scrub. The climate is dry with rains in summer, the average annual temperature is 16.5 °C; the maximum average annual temperature is 24.8 °C and the minimum average temperature is 8.5 °C. The minimum annual precipitation is 238 mm; the period of highest precipitation occurs between the months of June and September. Data was obtained from the climatological station of the Campo Experimental San Luis Potosí of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, 2018) located at 1 km from the study area. The fauna of the municipality consists of dominant species such as coyote, hares, birds, and snakes. Lands are shared with agricultural crop activities and grass to raise cattle (INAFED, 1986).

The soil is alluvial with no rocks. Only in the north and the northeast there are small outcrops of limestone, as well as rhyolite, basalt, and tuff. The predominant soil types are eutric lithosol in the north and northeast, medium textured haplic xerosol in the west and the southeast, and medium texture luvic phaeozem and luvic astanozem. The slopes are less than 8 % flat in the north. Soils are suitable for livestock use. The current soil uses are agricultural with reduced yields and extensive grazing (INEGI, 2013).

Inventory of vegetation

In order to know the habitat conditions where the small mammals grow and determine the food sources, an inventory of the vegetation in the area was developed by considering the sampling within a perimeter of 100 m from the road limits and man-made constructions. The point intercept method was used to obtain the floristic composition and coverage of the existing species (Herrick et al., 2005), in georeferenced 100 m-transects.

Sampling

The animal trapping from the wild was developed in two periods. The first sampling was conducted from August to December 2015 and the second one from April to June 2016. Trappings were conducted with rectangular Tomahawk live traps for small mammals, made of wire mesh and folding. Also, strong smell baits were used, in this case, a mix of apple and oat, impregnated with vanilla. The fauna management was conducted always based on the animal welfare considerations.

madrigueras, los animales están en contacto constante con el suelo y con artroconidios que pueden infectar a los especímenes animales. Los objetivos del estudio fueron detectar anticuerpos contra *Coccidioides immitis* en el suero de mamíferos silvestres de talla pequeña mediante la técnica de inmunodifusión doble en agar, así como describir las características del hábitat de esos animales.

Materiales y métodos

Zona de estudio

La colecta de las muestras se llevó a cabo en el *ejido* Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez del estado de San Luis Potosí, México. El sitio de estudio se ubica a una altura promedio de 1 834 msnm, con una vegetación tipo que corresponde a un matorral inerme parvifolio, rosetofilo e izotal. El clima es seco con lluvias en verano; la temperatura media anual es de 16.5 °C; la temperatura máxima media anual es de 24.8 °C y la temperatura mínima media anual es de 8.5 °C. Con respecto a la precipitación, la mínima anual es de 238 mm; el periodo de mayor precipitación pluvial está comprendido entre los meses de junio y septiembre. Los datos corresponden a la estación climatológica del Campo Experimental San Luis Potosí del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, 2018) ubicado a 1 km del sitio de estudio. La fauna del municipio está compuesta por las especies dominantes como coyote, liebres, aves y serpientes. Las tierras son compartidas con actividades de cultivo agrícola y gramíneas para la cría de ganado (INAFED, 1986).

El suelo es aluvial con ausencia de rocas. Únicamente en el norte y el noreste se encuentran pequeños afloramientos de caliza, así como riolita, basalto y toba. Los tipos de suelo predominantes son litosol eútrico en el norte y noroeste, xerosol háplico de textura media en el oeste y el sureste, y phaeozem lúvico y castañozem lúvico de textura media. Las pendientes son planas menores al 8 % en el norte. Los suelos son aptos para uso pecuario. Los usos actuales del suelo son agricultura con rendimientos reducidos y pastoreo extensivo (INEGI, 2013).

Inventario de vegetación

Con las finalidades de conocer las condiciones del hábitat en donde se desarrollan los pequeños mamíferos y determinar las fuentes de alimento se realizó un inventario de la vegetación del sitio, considerando el muestreo a partir de un perímetro de 100 m de los límites de caminos y construcciones humanas. El método de intercepto en un punto se utilizó para obtener la composición florística y cobertura de las especies existentes (Herrick et al., 2005), en transectos de 100 m, georreferenciados.

The trapped specimens were weighted to determine the dose of anesthetics applied: a) Xylazine hydrochloride with a concentration of 10 mg·kg⁻¹ live weight for *Rattus norvegicus*, *Neotoma sp.* and *Didelphis virginiana*, and 20 mg·kg⁻¹ live weight for *Sciurus oculatus* and *Otospermophilus variegatus*; b) Ketamine hydrochloride at 80 mg·kg⁻¹ live weight for *S. oculatus*, *O. variegatus*, *R. norvegicus*, *Neotoma sp.* and 20 mg·kg⁻¹ live weight for *D. virginiana*. When trapped animals were found in the surgical anesthetic plane, the blood sample was taken by cardiac puncture and blood was placed in a Vacutainer tube without anticoagulant. Subsequently, animals were protected to avoid hypothermia and their corneas were lubricated. The blood samples were allowed to settle for approximately one hour at room temperature to obtain the serum, which was separated and frozen at -20 °C until processed. The pregnant or lactating females were freed or excluded.

Double agar immunodiffusion tes

The detection of antibodies against *C. immitis* was developed through the double agar immunodiffusion (DID), technique described by Ouchterlony (Stanley, 2002). On a Petri dish of 60 x 15 mm, 7 mL of agar 3 % purified with a pH of 7.2 at 60 °C were poured. Once it was solidified, a central well and six wells of about 5 mm in diameter were perforated, each one with a separation of 4 mm between them. 50 mL of antigen (Ag) were placed into the central well, it is a crude extract derivative of cell membrane proteins from *C. immitis* obtained from the yeast phase and 50 mL of each serum to be analyzed were placed into the six equidistant wells. The plate was incubated for 24 h at room temperature in wet chamber. The analysis was visually developed at 48 and 72 h of incubation, considering as positive those cases in which the shape of an identity line of the serum used was appreciated (Figure 1).

Statistical analysis

In order to compare the collects conducted during the rainy and dry season, with the cases of positive or negative DID, a factorial Analysis of Variance was developed, while, to determine if the differences were significant ($P < 0.05$), a Tukey test was conducted with the STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.) software. Figures were made with the SigmaPlot (Systat Software, Inc) software.

Results and discussion

Characterization of the vegetation

The characterization of the vegetation in the border of the study area (Figure 2) suggests that the northern area has a greater coverage of herbaceous species, mainly of native grasses species such as *Sporobolus airoides* (11.52 %)

Muestreo

Las capturas de los animales silvestres se llevaron a cabo en dos periodos. El primer muestreo se efectuó de agosto a diciembre del 2015 y el segundo de abril a junio del 2016. Las capturas se realizaron con trampas Tomahawk para mamíferos de talla pequeña, rectangulares, de reja de alambre y plegadizas. También, cebos de olor intenso se emplearon, en este caso una mezcla de manzana y avena, impregnados con vainilla. En todo momento, el manejo de la fauna se hizo con base en las consideraciones de bienestar animal.

Los individuos capturados fueron pesados para determinar la dosis de los anestésicos que se aplicaron: a) Clorhidrato de xilacina a una concentración de 10 mg·kg⁻¹ de peso vivo para *Rattus norvegicus*, *Neotoma sp.* y *Didelphis virginiana*, y 20 mg·kg⁻¹ de peso vivo para *Sciurus oculatus* y *Otospermophilus variegatus*; b) Clorhidrato de ketamina a 80 mg·kg⁻¹ de peso vivo para *S. oculatus*, *O. variegatus*, *R. norvegicus*, *Neotoma sp.* y 20 mg·kg⁻¹ de peso vivo para *D. virginiana*. Cuando los animales capturados se encontraron en plano anestésico quirúrgico se obtuvo la muestra sanguínea por punción cardíaca y la sangre se colocó en un tubo Vacutainer sin anticoagulante. Posteriormente, los animales se protegieron para evitar hipotermia y se lubricaron sus córneas. Las muestras de sangre se dejaron reposar aproximadamente una hora a temperatura ambiente para la obtención del suero, el cual fue separado y conservado en congelación a -20 °C hasta su procesamiento. Las hembras gestantes o lactando se liberaron o excluyeron.

Prueba de inmunodifusión doble en agar

La detección de anticuerpos contra *C. immitis* se realizó mediante la técnica de inmunodifusión doble en agar (IDD) descrita por Ouchterlony (Stanley, 2002); sobre una caja de Petri de 60 x 15 mm se vertieron 7 mL de agar purificado al 3 % con un pH 7.2 a 60 °C. Una vez solidificado, un pozo central y seis pozos alrededor de 5 mm de diámetro cada uno con una separación de 4 mm entre ellos fueron perforados. En el pozo central se colocaron 50 mL del antígeno (Ag), un derivado de extracto crudo de proteínas de membrana celular de *C. immitis* obtenido de la fase levaduriforme y en los seis pozos equidistantes se colocaron 50 mL de cada uno de los sueros a analizar. La placa se incubó durante 24 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. El análisis se hizo visualmente a las 48 y 72 h de incubación, considerando como positivos aquellos casos en el que se apreció la forma de una línea de identidad del suero utilizado (Figura 1).

Análisis estadístico

Para comparar las temporadas de colecta lluviosa y de sequía, con los casos de IDD positivos o negativos, se

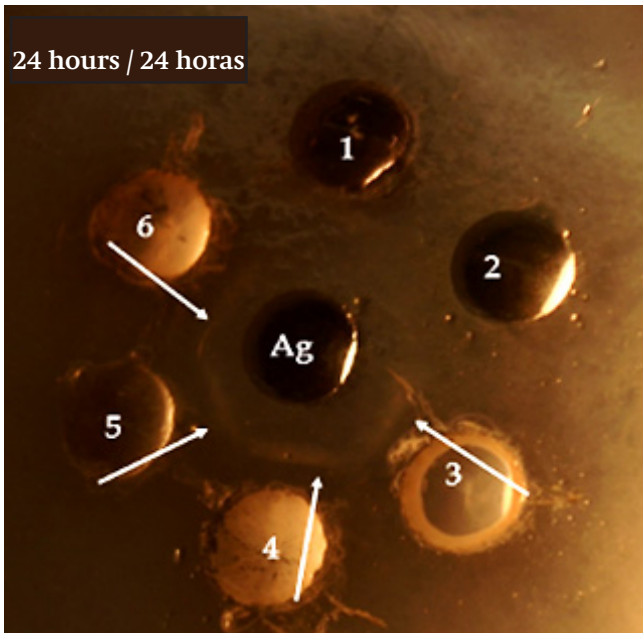


Figure 1. Double immunodiffusion technique in the studied samples. Ag was placed into the central well and into the equidistant wells, test samples were placed.

Figura 1. Prueba de IDD en las muestras del estudio. En el pozo central se colocó el Ag y en los pozos de la periferia se colocaron muestras problema; las flechas marcan la línea de precipitación Antígeno-Anticuerpo que se interpreta como positiva.

and *Digitaria decumbens* (13.25 %). On the contrary, the southern area shows a greater coverage of tree species, mainly *Prosopis laevigata* (18.06 %) as historically dominant in the area, and *Eucalipto camaldulensis* (8.78 %), introduced species in the area. Both areas, northern and southern, have a similar coverage of the tree stratum with 24.06 and 26.35 %, respectively; nevertheless, the composition was variable, in the north, the species *Cylindropuntia imbricata* (6.78 %) and *Opuntia* spp. (6.44 %) predominate; while in the south, *Streptacantha cardon* (10.13 %) and *Larrea tridentata* predominate (7.43 %).

Sampling and detection of antibodies against *Coccidioides immitis*

A total of 54 specimens were trapped. In the first sampling, 23 specimens (22 of *Sciurus oculatus* and 1 of *Otospermophilus variegatus*) were trapped; and in the second one, 31 specimens (2 of *Didelphis virginiana*, 2 of *Rattus norvegicus*, 1 of *Neotoma* spp., 20 of *Sciurus oculatus* and 6 of *Otospermophilus variegatus*) (Table 1).

Positive samples and seasonality

Regarding the results obtained and considering the time of the year in which the sampling was developed,

llevó a cabo un Análisis de Varianza factorial, mientras que para determinar si las diferencias eran significativas ($P < 0.05$) se hizo una prueba de Tukey con el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.). Las figuras se hicieron con el software SigmaPlot (Systat Software, Inc).

Resultados y discusión

Caracterización de vegetación

La caracterización de la vegetación en la franja que rodea al área de estudio (Figura 2) sugiere que el sitio norte tiene una mayor cobertura de especies herbáceas, principalmente de especies de zacates nativos como *Sporobolus airoides* (11.52 %) y *Digitaria decumbens* (13.25 %). Por el contrario, el sitio sur presenta mayor cobertura de especies arbóreas, principalmente *Prosopis laevigata* (18.06 %) como históricamente dominante en el sitio y *Eucalipto camaldulensis* (8.78 %), especie introducida en el área. Ambos sitios, norte y sur, poseen una cobertura similar del estrato arbustivo con 24.06 y 26.35 %, respectivamente; no obstante, la composición fue variable; en el norte predominan las especies *Cylindropuntia imbricata* (6.78 %) y *Opuntia* spp. (6.44 %); mientras que en el sur predominan *Streptacantha cardon* (10.13 %) y *Larrea tridentata* (7.43 %).

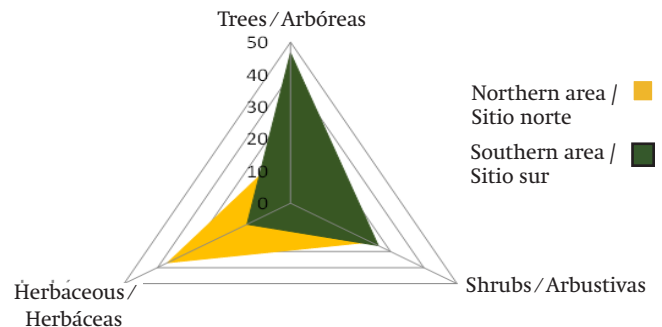


Figure 2. Coverage average of the study area. Values represent the percentages in different vegetation strata that make up the border of the area in the Ejido Palma de la Cruz, San Luis Potosí, Mexico.

Figura 2. Porcentaje de cobertura del área de estudio. Los valores representan los porcentajes de los diferentes estratos de vegetación que conforman la franja que rodea el área en el Ejido Palma de la Cruz, San Luis Potosí, México.

Muestreo y detección de anticuerpos contra *Coccidioides immitis*

Un total de 54 individuos fue capturado. En el primer muestreo se capturaron 23 individuos (22 de *Sciurus oculatus* y 1 de *Otospermophilus variegatus*); y en el segundo 31 individuos (2 de *Didelphis virginiana*, 2 de *Rattus norvegicus*, 1 de *Neotoma* spp., 20 de *Sciurus oculatus* y 6 de *Otospermophilus variegatus*) (Cuadro 1).

Table 1. Species of the trapped specimens for samplings.**Cuadro 1.** Especies de individuos capturados en los muestreos.

Genre and species / Género y especie	Common name / Nombre común	First sampling / Primer muestreo	Second sampling / Segundo muestreo
<i>Didelphis virginiana</i>	North American opossum / Tlacuache norteño	0	2
<i>Neotoma</i> sp.	Wood mouse / Ratón de campo	0	1
<i>Otospermophilus variegatus</i>	Rock squirrel / Ardillón	1	6
<i>Rattus norvegicus</i>	Common rat / Rata gris	0	2
<i>Sciurus oculatus</i>	Squirrel / Ardilla	22	20
	Total	23	31

Results of the DID tests allowed to detect that 42.5 % (23/54) of the analyzed serums presented antibodies towards *C. immitis*, mainly in the *S. oculatus* (21) and *O. variegatus* (2) species. The positive reaction in the samples was observed from 24 h of incubation (Figure 1).

Los resultados de las pruebas de IDD permitieron detectar que el 42.5 % (23/54) de los sueros analizados presentaban anticuerpos hacia *C. immitis*, principalmente en las especies de *S. oculatus* (21) y *O. variegatus* (2). La reacción de positividad en las muestras se observó desde las 24 h de incubación (Figura 1).

the 73.9 % (17/23) of the total positive samples was obtained during the rainy season, while the 26.1 % (6/23) was shown in the dry season (Figure 3). During the dry season, a greater number of specimens was collected (n=31) compared with the rainy season (n=23). The statistical analysis suggests that the season*IDD interaction is significant. The greater number of positive specimens is associated with the rainy season with an average of 2.83 ± 0.79 , while the fewest number corresponds to the dry season (0.83 ± 0.31); the difference is significant ($P < 0.005$). Also, a greater number of non-infected specimens corresponds to the dry season (3.66 ± 0.76) (Figure 4).

As far as we are aware, this is the first inform that evidences the detection of antibodies against *Coccidioides immitis* in small wild mammals in the Potosino Plateau. Results shows 42.5 % of positive samples in the detection of antibodies against the fungus. The highest percentage (91.3 %) corresponds to the *S. oculatus* species. Also, the composition of the habitat in the area is suitable for the sampled fauna development and probably it plays a key role in the fungus biological cycle that could lead to consider it as a reservoir.

Some molecular studies indicate the presence of *C. immitis* in the soil of wild fauna burrows in Baja California, Mexico (Baptista-Rosas et al., 2012). Likewise, coccidioidal antibodies in wild rodents from this study area, have been evidenced (Catalán-Dibene et al., 2014). Results strengthen the knowledge about the role that wild fauna may be playing in the fungus biological cycle development as disseminators or

Muestras positivas y estacionalidad

Con relación a los resultados obtenidos y considerando la época del año en que se realizó el muestreo, el 73.9 % (17/23) de las muestras totales positivas se obtuvo en la temporada de lluvia; mientras que el 26.1 % (6/23) se presentó en la época de sequía (Figura 3). En la temporada de sequía se colectó un número mayor de individuos (n=31) que en la temporada de lluvia (n=23). El análisis estadístico sugiere que la interacción temporada*IDD es significativa. El número mayor de individuos positivos se asocia a la temporada de lluvia con un promedio de 2.83 ± 0.79 , mientras que la menor corresponde a la temporada de sequía (0.83 ± 0.31); la diferencia es significativa ($P < 0.005$). Además, un número mayor de individuos no infectados corresponde a la temporada de sequía (3.66 ± 0.76) (Figura 4).

Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer informe que evidencia la detección de anticuerpos contra *Coccidioides immitis* en mamíferos pequeños silvestres en el Altiplano Potosino. Los resultados indican 42.5 % de muestras positivas a la detección de anticuerpos contra el hongo; el porcentaje mayor (91.3 %) corresponde a la especie *S. oculatus*. Además, la conformación del hábitat del lugar es propicio para el desarrollo de la fauna muestreada y muy probablemente juega un papel importante en el ciclo biológico del hongo que pudiera llevar a considerarla como reservorio.

Algunos estudios moleculares indican la presencia de *C. immitis* en el suelo de madrigueras de fauna silvestre en Baja California, México (Baptista-Rosas et

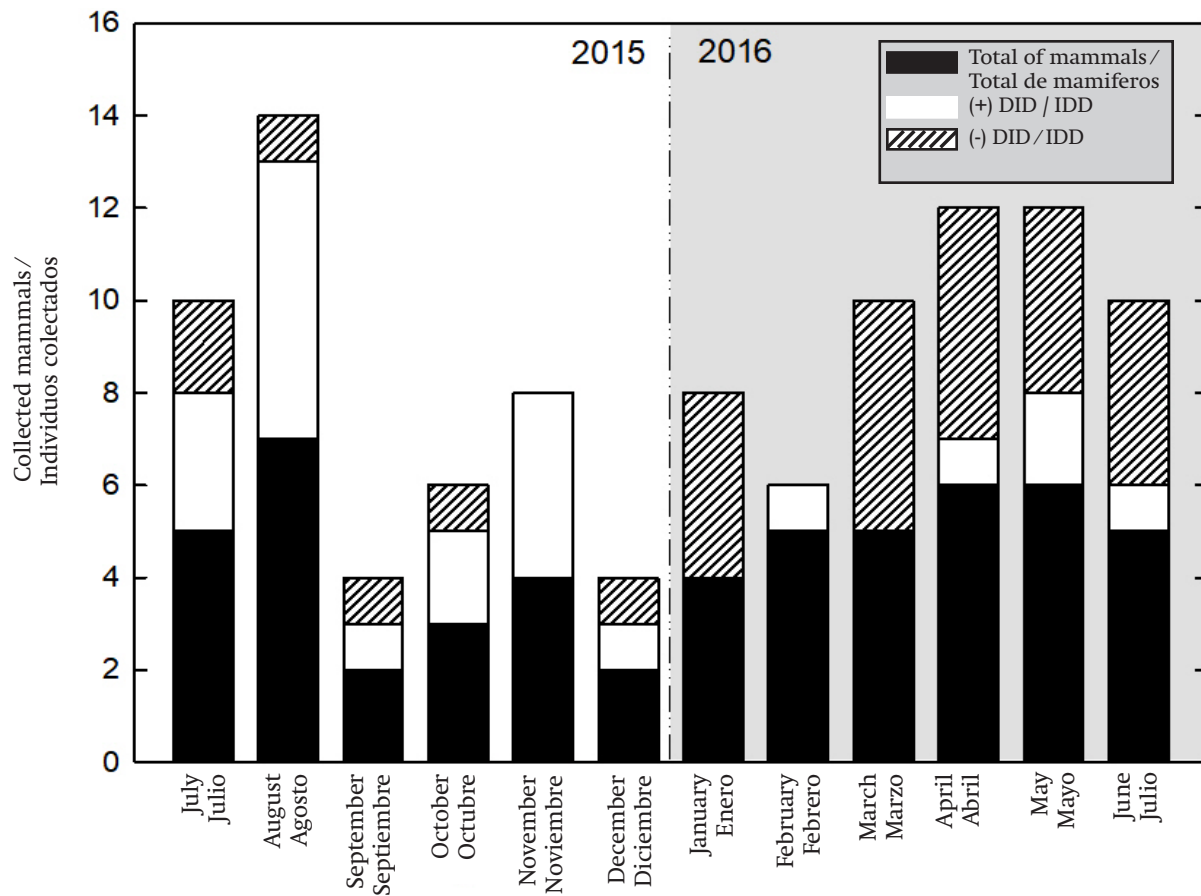


Figure 3. Sampling in two collection seasons (2015-2016). During the rainy season in 2015 and the dry season in 2016.
Figura 3. Muestreo en dos temporadas de colecta (2015-2016). Durante la temporada de lluvia en el 2015 y de sequía del 2016.

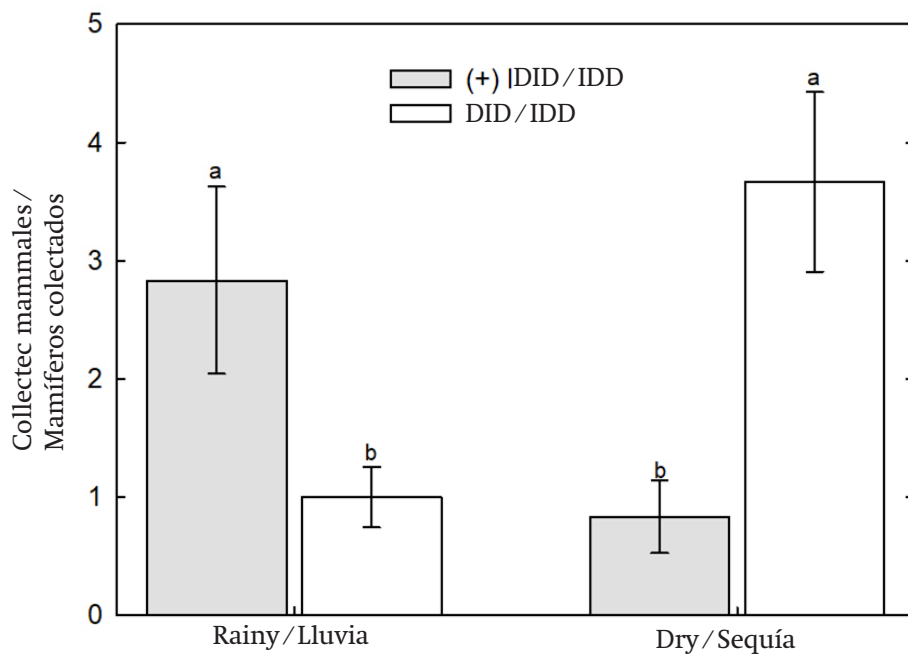


Figure 4. Comparison of the positive and negative DID cases. Samples developed during the rainy (2015) and dry (2016) seasons; bars represent $\bar{x} \pm EE$.

Figura 4. Comparación de los casos de IDD positivos y negativos. Muestreos realizados durante la temporada de lluvia (2015) y sequía (2016); las barras representan la $\bar{x} \pm EE$.

reservoirs (Catalán-Dibene et al., 2014; Baptista-Rosa et al., 2012; Reyes-Montes et al., 2016). The animal activity could be associated with the presence of the fungus within the habitat (Kollath et al., 2019). This latter fact suggests that *C. immitis* evolved to remain in the granuloma of hosts without causing a disease, creating a structure called endozoans; thus, once the animal is dead, the fungus can be released to continue with its mycelial phase and to use the organic matter of the body as substratum (Taylor & Baker, 2019). These events will lead to the formation of arthroconidia that can be acquired in the environment by susceptible hosts; this implies a key role of the wild fauna in the dispersion and participation in the fungus cycle within endemic areas (Taylor and Bayker, 2019; Reyes-Montes, 2016).

In this study, a greater number of specimens that showed antibodies against *C. immitis* was detected during the rainy season ($P < 0.005$). Regarding the previous result, it can be said that the fungus biological cycle can be influenced by levels of humidity in the soil during the summertime, favoring the development and transmission of arthroconidia after the rainy season, which can be associated to an increase in the number of clinical cases reported one or two years after weather anomalies (Coopersmith et al., 2017). A recent proposal presents the relationship between climatic events and wild fauna, because when precipitation increases, the growth and number of plants increase, this is favorable to increase the wild fauna population. It was reflected on the increase of the number of dead animals that were reservoirs for the fungus, in this way, this process can contribute to the return of the fungus to the environment in later years (Taylor and Bayker, 2019).

The plant composition of the study area reflects the existence of cultivated species because it is an agricultural area. The specimens of animal species have a proper habitat for their survival because they have the necessary plant components to feed, including supplementary food sources of natural and anthropic origin from warehouses and crops. Research on changes in land use (Imre and Derbowka, 2011) suggests that, in urban and suburban areas, mammals of medium size such as the gray fox (Baker, Funk, et al., 2000), squirrels (McCleery, et al., 2007), coyote (Poessel, et al., 2014), opossums (Beatty, et al., 2014) and raccoon, among others, survive and even increase their populations (Bateman & Fleming, 2012). The aforementioned events could favor the fungus cycle as they provide abundant food and, thus, influence the presence and increase of *C. immitis* in the habitat. To clarify this approach, the research shall be expanded when analyzing more serum samples, including the granuloma collection, as well as the soil samples from burrows that allow to carry out a monitoring of the fungus prevalence in the wild fauna of the Potosino Plateau.

al., 2012). Asimismo, anticuerpos coccidioidales en roedores silvestres de esa misma zona de estudio han sido evidenciados (Catalán-Dibene et al., 2014). Los resultados fortalecen el conocimiento del papel que puede estar jugando la fauna silvestre en el desarrollo del ciclo biológico del hongo como diseminadores o reservorios (Catalán-Dibene et al., 2014; Baptista-Rosa et al., 2012; Reyes-Montes et al., 2016); la actividad animal podría asociarse a la presencia del hongo en el hábitat (Kollath et al., 2019). Esto último sugiere que *C. immitis* evolucionó para permanecer dentro del granuloma de los hospederos sin causar enfermedad, formando una estructura llamada endozoos; entonces, una vez que el animal haya muerto, el hongo puede ser liberado para pasar a su fase miceliar utilizando como sustrato la materia orgánica del cadáver (Taylor & Baker, 2019). Estos eventos conducirían a la formación de los arthroconidios que en el ambiente podrían ser adquiridos por hospederos susceptibles; ello implica un papel fundamental de la fauna silvestre en la dispersión y participación en el ciclo del hongo en las zonas endémicas (Taylor y Bayker, 2019; Reyes-Montes, 2016).

En el presente estudio se detectó un número mayor de individuos que presentaron anticuerpos contra *C. immitis* en la estación de lluvia ($P < 0.005$). Con respecto al resultado anterior se puede mencionar que el ciclo biológico del hongo puede ser influenciado por los niveles de humedad en el suelo en la época de verano, favoreciendo el desarrollo y transmisión de los arthroconidios después de la época de lluvias, lo que se puede asociar a un aumento en el número de casos clínicos reportados uno o dos años después de anomalías meteorológicas (Coopersmith et al., 2017). Una propuesta reciente plantea la asociación de los eventos climáticos con la fauna silvestre, pues al aumentar la precipitación se incrementan el crecimiento y la cantidad de plantas; ello es favorable para aumentar la población de fauna silvestre. Esto se reflejó en un aumento de la cantidad de animales muertos que fueron reservorio del hongo; así, este proceso puede contribuir al regreso del hongo al ambiente en años posteriores (Taylor y Bayker, 2019).

La composición vegetal de la zona de estudio refleja la presencia de especies cultivadas debido a que es una zona agrícola. Los individuos de especies animales poseen un hábitat adecuado para su supervivencia, pues cuentan con los componentes de vegetación necesarios para alimentarse, incluyendo fuentes suplementarias de alimento de origen natural y antrópico proveniente de bodegas y cultivos. Investigaciones sobre cambios en el uso de suelo (Imre y Derbowka, 2011) sugieren que, en áreas urbanas y suburbanas, los mamíferos de porte mediano como zorra gris (Baker, Funk, et al., 2000), ardillas (McCleery, et al., 2007), coyote (Poessel, et al., 2014), tlacuache (Beatty, et al., 2014) y mapache, entre otros, logran sobrevivir e incluso incrementar sus

The coccidioidomycosis is a relevant disease due to the condition it causes in human population, in recent years, its prevalence has increased (Kirkland and Fierer, 2018). While it is associated with a better diagnosis, with an increase in the change of residence, as well as the growth of human activities on contaminated soil, among other causes, it makes no sense to ignore the influence of climate change on the increase in the disease (Kollath et al., 2019). In this context, cases linked to sandstorms can favor the spread of spores to non-endemic regions or tremors that by moving the soil layers allow the spores to slide (Kollath et al., 2019; Kirkland and Fierer, 2018). Also, the increase in temperature and decrease in rainy precipitation can have effects on arid and semi-arid ecosystems that could favor the spread of the fungus and the incidence of the disease; this represents an important scenario that shall be considered in public health (Baptista-Rosas, 2012). Further research with a substantial number of samples shall include serum and lymph nodes from wild fauna and domestic animals, as well as consider a wider study area and use diverse molecular tools for diagnosis. It is a proposal because the topic implies situations of interest in the public health and animal health contexts.

Conclusions

With the information obtained, it is proposed that the wild fauna, the habitat, and weather conditions can favor the *Coccidioides immitis* biological cycle within the region of the Potosino Plateau. Also, due to antibodies against the fungus were detected, the wild fauna can be used as area indicator to monitor the existence of this microorganism.

End of English Version

References / Referencias

- Bateman, P. W., y Fleming, P. A. (2012). Big city life: carnivores in urban environments. *Journal of Zoology*, 287(1), 1-23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2011.00887.x>
- Barker, B. M., Tabor J. A., Shubitz, L. F. Perrill, R., y Orbach M. J. (2012). 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>
- Barker, B. M., Litvintseva, A. P., Riquelme, M., y Vargas-Gastelum, L. (2019). *Coccidioides* ecology and genomics. *Medical Mycology*, 57(S1), S21-S29. DOI: 10.1093 / mmy / myy051
- Baker, P. J., Funk, S. M., Harris, S., y White, P. C. (2000). Flexible spatial organization of urban foxes *Vulpes*, before and during an outbreak of sarcoptic mange.

poblaciones (Bateman & Fleming, 2012). Los eventos ya señalados podrían estar favoreciendo el ciclo del hongo al aportar alimento abundante y, por lo tanto, estar influyendo sobre la presencia y aumento de *C. immitis* en el hábitat. Para elucidar este planteamiento se debe ampliar la investigación al analizar más muestras de sueros, incluir la obtención de granulomas, así como de muestras de suelo de las madrigueras que permitan hacer un seguimiento de la prevalencia del hongo en la fauna silvestre del Altiplano Potosino.

La coccidioidomycosis es una enfermedad relevante debido a la afección que ocasiona en la población humana; en los últimos años se ha visto aumentada su prevalencia (Kirkland y Fierer, 2018). Si bien esto se asocia a un mejor diagnóstico, a un aumento en el cambio de residencia, así como al crecimiento de las actividades humanas en suelos contaminados, entre otras causas, carece de sentido descartar la influencia del cambio climático sobre el aumento de la enfermedad (Kollath et al., 2019). En este contexto, casos vinculados a tormentas de arena pueden favorecer la propagación de las esporas a regiones no endémicas o temblores que al mover las capas de suelo permiten el deslizamiento de las esporas (Kollath et al., 2019; Kirkland y Fierer, 2018). Además, el aumento de la temperatura y la disminución de precipitaciones pluviales pueden tener efectos sobre los ecosistemas áridos y semiáridos que podrían favorecer la dispersión del hongo y la incidencia de la enfermedad; ello representa un escenario importante a tomar en cuenta en salud pública (Baptista-Rosas, 2012). Investigaciones futuras con un mayor número de muestras deben incluir suero y linfonodos provenientes de fauna silvestre y animales domésticos, así como considerar una zona de estudio más amplia y utilizar para el diagnóstico herramientas moleculares diversas. Esto se propone debido a que el tema conlleva a situaciones de interés en los contextos de salud pública y salud animal.

Conclusiones

Con la información obtenida se propone que la fauna silvestre, el hábitat y las condiciones climáticas pueden favorecer el ciclo biológico de *Coccidioides immitis* en la región del Altiplano Potosino. Además, debido a que se detectaron anticuerpos contra el hongo, la fauna silvestre puede ser utilizada como indicador del área para monitorear la presencia de tal microorganismo.

Fin de la versión en español

- Animal Behavior*, 59(1), 127-146. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1285>
- Baptista-Rosas, R. C., Catalán-Dibene, J., Romero-Olivares, A., Hinojosa, A., Cavazos, T., y Riquelme, M. (2012).

- 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. doi:10.1016/j.funeco.2011.08.004
- Beatty, W. S., Beaseley, J. C., y Rhodes, O. E. (2014). Habitat selection by a generalist mesopredator near its historical range boundary. *Canadian Journal of Zoology*, 9(1), 41-48. <https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0225>
- Catalán-Dibene J., Johnson S., Eaton R., Romero-Olivares L., Baptista-Rosas R.C., Pappagianis D., y Riquelme M. (2014). Detection of coccidioidal antibodies in serum of a small rodent community in Baja California, Mexico. *Fungal Biology* 118(3): 330-339. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.01.006.
- Campins, H. (1970). Coccidioidomycosis in South America. A review of its epidemiology and geographic distribution. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 41(1), 25-34. DOI: 10.1007 / bf02051481
- Coopersmith, E. J., Bell, J. E., Benedict, K., Shriber, J., McCotter, O., y Cosh, M. H. (2017). Relating coccidioidomycosis (Valley fever) incidence to soil moisture conditions. *Geohealth* 1, 51–63. DOI: 10.1002 / 2016GH000033
- Fisher, F. S., Bultman, M. W., Johnson, S. M., Pappagianis, D., y Zaborsky E. (2007) *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States a matter of scale. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1111: 47–72. DOI: 10.1196 / anales.1406.031
- Guevara-Olvera L., Hung Y.C., Yu J., y Cole G. (2000). Sequence, expression and functional analysis of the *Coccidioides immitis* ODC (ornithine decarboxilase) gene. *Gene* 242(1-2), 437-448. DOI: 10.1016 / s0378-1119 (99) 00496-5
- Herrick, J., Van Zee J., K. Havstad, L. Burkett, y W. Whitford. (2005). *Monitoring manual for grassland, shrubland and savanna ecosystems*. Tucson, AZ: University of Arizona Press.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). (1986). H. Ayuntamiento de Soledad de Graciano Sánchez. *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. Mayo 2016, de Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo. Sitio web: www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM24sanluispotosi/municipios/24035a.html
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2013). Conjunto de datos vectoriales de la carta de Uso del suelo y vegetación serie III. Continuo Nacional. San Luis Potosí. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825570385>
- Imre, I., y Derbowka, D. (2011). Major threats facing terrestrial mammals in Canada. *The Canadian Field Naturalist*, 125(3), 213-219. DOI: 10.22621/dfn.v125i3.1223
- Kirkland, T. N., y Fierer, J. (2018). *Coccidioides immitis* and *posadasii*: A review of their biology, genomics, pathogenesis, and host immunity. *Virulence*, 9(1), 1426–1435. DOI: 10.1080 / 21505594.2018.1509667
- Kollath, D. R., Miller, K. J., y Barker, B. M. (2019). The mysterious desert dwellers: *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*, causative fungal agents of coccidioidomycosis. *Virulence*, 10(1), 222–233. DOI: 10.1080 / 21505594.2019.1589363.
- Matuk-Peréz, Y., Rodríguez, L. I., Torres, C. J., Oros, O. C., y De La Rosa, Q. C. (2014). Coccidioidomycosis meníngea: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista Mexicana Neurociencias*, 5(4): 224-228. URL: https://pdfs.semanticscholar.org/8065/ca719d9df7a007504f6f7afb81a6b77fc1f3.pdf?_ga=2.248179585.76851129.1585953926-2056586588.1585953926
- Mayorga, R. P., y Espinoza, H. (1970). Coccidioidomycosis in México and Central America. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, 41(1), 13–23. DOI: 10.1007 / bf02051480
- McCleery, R., Lopez, R. R., Silvy, N. J., y Kahlick, S. N. (2007). Habitat use of fox squirrels in an urban environment. *Journal of Wildlife Management*, 71(4), 1149-1157. DOI: 10.219372006-282
- Medina- García G, Díaz- Padilla G, Loredó-Ostí C, Serrano-Altamirano V, Cano-García MA. 2001. INIFAP. 2001. Estadísticas climatológicas básicas del estado de San Luis Potosí (Período 1961-2001). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigaciones Regional Noreste Campo Experimental San Luis.
- Nguyen, C., Barker, B. M., Hoover, S., Nix, D. E., Ampel, N. M., Frelinger, J. A., Orbach, M. J., y Galgiani, J. N. (2013). Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 505–525. DOI: 10.1128 / CMR.00005-13
- Poessel, S. A., Gese, E. M., y Young, J. K. (2014). Influence of habitat structure and food on patch choice of captive coyotes. *Applied Animal Behaviour Science*, 157, 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.05.001>
- Rodríguez-Cerdeira, C., Arenas, R., Moreno-Coutiño, G., Vásquez, E., Fernández, R., y Chang, P. (2014). Systemic fungal infections in patients with human immunodeficiency virus. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 105(1), 5-17. DOI: 10.1016 / j.ad.2012.06.017
- Reyes-Montes, M. R., Pérez, M. A., Ocaña-Monroy, J. L., Frías-De-León, M. G., Martínez-Herrera, E., Arenas, R., y Duarte-Escalante, E. (2016). The habitat of *Coccidioides* spp. and the role of animals as reservoirs and disseminators in nature. *BMC Infectious Diseases*, 16, 550. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1902-7>
- Stanley, J. (2002). *Essentials of Immunology & Serology* Medical Lab Technician Series. Detroit, Michigan: Cengage Learning.
- Taylor, J. W., y Barker, B. M. (2019). The endozoan, small-mammal reservoir hypothesis and the life cycle of *Coccidioides* species. *Medical Mycology*, 57(S1), S16–S20. DOI: 10.1093 / mmy / myy039
- Valdivia, L., Nix, D., Wright, M., Lindberg, E., Fagan, T., Lieberman, D., Stoffer, T. P., Ampel, N. M., y Galgiani, J. N. (2006). Coccidioidomycosis as a common cause of community-acquired pneumonia. *Emerging*

- Infectious Diseases, 12(6), 958-962. DOI: 10.3201 / eid1206.060028
- Vargas-Gastelum, L., Romero-Olivares, A. L., Escalante, A. E., Rocha-Olivares, A., Brizuela, C., y Riquelme, M. (2015). Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(5). DOI: 10.1093 / femsec / fiv044