



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL
“DR. MANUEL GEA GONZALEZ”

**Clasificación molecular de las especies y variabilidad genética
de las subespecies de *Nocardia* aisladas en el
Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y en el
centro dermatológico “Dr. Fernando Latapí” de Yucatán,
mediante la secuencia de la subunidad 16S rRNA y *hsp65***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGÍA

PRESENTA:

NICOLE STEPHANIE KRESCH TRONIK

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO ARENAS GUZMAN

DR. RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Dermatología, Micología y Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” bajo la Dirección del Dr. Roberto Arenas Guzmán y del Dr. Rigoberto Hernández Castro.

Este trabajo de Tesis con Protocolo No. 06-19-2010, presentado por el alumno Nicole Stephanie Kresch Tronik se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Roberto Arenas Guzmán y Dr. Rigoberto Hernández Castro con fecha del 30 julio 2010 para su impresión final.

Tutor principal: Dr. Roberto Arenas Guzmán.
Dr. Rigoberto Hernández Castro

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. Elisa Vega Memije
Jefa del Departamento de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

AGRADECIMIENTOS:

A Ricardo, mi esposo, a quien más amo, gracias por ser la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor, por ser mi ayuda idónea, por tu amor, comprensión y motivación, sin lo que hubiese sido imposible lograr terminar mi carrera.

A ti que traes tanta felicidad a mi vida, me das una enorme fuerza interior y me impulsas cada día a ser mejor.

A mi mamá por darme una carrera para mi futuro, por estar dispuesta en cualquier momento a cualquier hora y para todo, por acomodarme el camino para que sea más fácil de recorrer, por tus consejos, por enseñarme a nunca rendirme y a siempre seguir. Todo lo que soy es gracias a ti.

A mi papá porque aunque no estés aquí siempre has estado presente.

A Ariel, por siempre creer en mí, por darme seguridad y nunca dudar que yo puedo.

A mis hermanos y sobrinos, por alegrarme el día a día y relajar los momentos de tensión.

A mis abuelos por su apoyo en todas las decisiones que he tomado en la vida por ser siempre incondicionales y una mano fuerte de donde apoyarme.

A mis suegros, cuñados, con cuñíos y sobrinos por ser un gran apoyo, por creer en mí y compartir estos momentos tan importantes conmigo.

A mis maestros; Al Dr. Arenas por ser un gran maestro por enseñarme tanto de dermatología pero también de la vida, por ser un ejemplo a seguir; muchas gracias, por su dirección, ayuda, paciencia, entrega y valiosos consejos. Al Dr. Dominguez, Dra. Hojyo, Dra. Dominguez, Dra. Lacy, Dra. Toussaint, Dra. Vega, Vero F, Jose C, Gaby, Elsa, Ramón, Dr. De La Barreda, Dany, Marcia, Agie, Vero N y Dr. Mosqueda por su ejemplo de profesionalidad que nunca voy a olvidar, gracias por su ayuda, por compartir sus conocimientos, y por enseñarme cada día algo nuevo. Este logro también es suyo.

A Rigoberto por tanto esfuerzo, por siempre estar pendiente, por tu tiempo, por tu paciencia, por explicarme todo. A Liz, Adri, Luis, Fernando y Luis por estar siempre dispuestos. Gracias por toda su ayuda en este proyecto.

Al Dr. Atoche por su participación tan importante en esta tesis.

A mis compañeros: Iris, Juan, Vicky, Tere, Sergio y Felipe por estos 3 increíbles años que no hubieran sido lo mismo sin ustedes, gracias por su apoyo y sobre todo gracias por su amistad.

Clasificación molecular de las especies y variabilidad genética de las subespecies de *Nocardia* aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y en el centro dermatológico “Dr. Fernando Latapí” de Yucatán, mediante la secuencia de la subunidad 16S rRNA y *hsp65*

Colaboradores:

Nombre: Nicole Stephanie Kresch Tronik

Firma: _____

Nombre: Roberto Arenas Guzmán

Firma: _____

Nombre: Rigoberto Hernández Castro

Firma: _____

Nombre: Gabriela Moreno Coutiño

Firma: _____

Nombre: Elsa Vázquez del Mercado

Firma: _____

Nombre: Ramón Fernández Martínez

Firma: _____

Nombre: Carlos Atoche

Firma: _____

INDICE

| | |
|--|----|
| Glosario | 8 |
| Relación de figuras y tablas..... | 9 |
| Resumen | 10 |
| Abstract..... | 11 |
| 1. Introducción y Antecedentes | 12 |
| Género <i>Nocardia</i> | 12 |
| Epidemiología..... | 12 |
| Cuadro clínico..... | 12 |
| Métodos Diagnósticos..... | 13 |
| Técnicas moleculares..... | 14 |
| 2. Justificación | 15 |
| 3. Hipótesis | 17 |
| 4. Objetivos..... | 17 |
| 5. Material y Métodos..... | 17 |
| 5.1. Tipo de estudio..... | 17 |
| 5.2. Ubicación temporal y espacial..... | 17 |
| 5.3. Criterios de selección de la muestra..... | 17 |
| 5.4 Criterios de eliminación..... | 18 |
| 5.5. Procedimiento..... | 18 |
| Cepas..... | 18 |
| Extracción de DNA..... | 18 |
| Amplificación de la subunidad 16S rRNA..... | 19 |
| Amplificación del gen <i>hsp65</i> | 19 |
| Secuenciación de los genes..... | 20 |
| Análisis filogenético..... | 20 |
| 6. Resultados..... | 22 |
| 7. Discusión | 33 |
| 8. Conclusiones..... | 37 |
| 9. Perspectivas | 38 |
| 10. Bibliografía..... | 39 |

GLOSARIO:

16S rRNA: Subunidad ribosomal 16S.

***hsp65*:** Gen que codifica para una proteína de choque térmico de 65 KDa.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

RNA: Acido ribonucleico.

KDa: Kilodaltons.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

***Nocardia*:** Bacterias filamentosas gram-positivas, aerobias, parcialmente acido alcohol resistente con tendencia a fragmentarse en formas bacilares y cocoides.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RELACION DE TABLAS Y FIGURAS:

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes, de los cuales se obtuvieron las muestras clínicas.

Tabla 2: Relación entre la clasificación molecular y presentación clínica.

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos del gen *hsp65* para diversas especies de *Nocardia*.

Tabla 4: Porcentaje de similitud nucleotídica entre secuencias del genero *Nocardia*.

Figura 1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación de la subunidad 16S rRNA. Carril 1. Marcador de peso molecular 1kb ladder. Carril 2-9. Muestras clínicas (18, 26, SyL, 86, 5701, 143, 170, 189).

Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación del gen *hsp65*. Carril 1. Marcador de peso molecular 1kb ladder. Carril 2-6. Muestras clínicas (18, 26, SyL, 86, 5701).

Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias de *Nocardia* spp. Usando la subunidad 16S rRNA. Los números en los nodos indican valores de probabilidad posteriores del análisis de UPGMA y Bayesiano.

Figura 4. Árbol filogenético de las secuencias de *Nocardia* spp. Usando el gen *hsp65*. Los números en los nodos indican valores de probabilidad posteriores del análisis de UPGMA y Bayesiano.

RESUMEN

ANTECEDENTES: Las especies de *Nocardia* son aisladas de infecciones cutáneas sobre todo en pacientes inmunocompetentes. Las pruebas fisiológicas y bioquímicas son poco sensibles y específicas para la identificación y diferenciación de *Nocardia* spp., el número de especies capaces de causar enfermedad humana fueron subestimadas cuando la identificación se realizaba por estos métodos. Recientemente la identificación y taxonomía de *Nocardia* spp ha mejorado con métodos moleculares como la secuenciación de la subunidad 16S rRNA y el gen *hsp65*.

OBJETIVO: Clasificar molecularmente a las especies y establecer la variabilidad genética entre las subespecies de *Nocardia*, cultivadas de infecciones cutáneas, subcutáneas, linfocutaneas y micetomas mediante la secuenciación de la subunidad 16S rRNA y del gen *hsp65*.

METODO: Se recolectaron todas las cepas cultivadas de *Nocardia* spp., aisladas de infecciones cutáneas, linfocutaneas y micetomas de enero a diciembre del 2009, en el Hospital Dr. Manuel Gea González, México, D.F. y el Centro dermatológico Dr. Fernando Latapí. Mérida, Yucatán. Se amplificaron, se purificaron los productos y se secuenciaron la subunidad 16S rRNA y el gen *hsp65*. La secuencia de nucleótidos se sometió a la base de datos del GenBank para buscar homologías y definir la especie.

RESULTADOS: Se recolectaron 19 cepas, de las cuales se excluyeron 2 debido a la pérdida de su viabilidad. 14 de las 17 cepas secuenciadas se clasificaron como *N. brasiliensis* (12 micetomas, 2 nocardiosis), una como *N. takedensis* y dos como *N. harenae*. La secuencia de la subunidad 16S rRNA mostro ligera variabilidad genética entre las especies de *N. brasiliensis*, por el contrario la secuencia de *hsp65* no mostro ninguna. Se identifico una infección mixta con *N. brasiliensis* y *Mycobacterium mageritensis*.

CONCLUSIONES: Primer estudio en México para secuenciar *Nocardia* en genes 16S rRNA y *hsp65*. Se presentan los dos primeros aislamientos de *N. harenae* de muestras clínicas y el primer caso en piel causado por *N. takedensis*. También por primera vez ambas especies se secuenciaron con el gen *hsp65*. Los métodos moleculares son de vital importancia en la identificación de las especies de *Nocardia*.

ABSTRACT

BACKGROUND: The *Nocardia* species are isolates of cutaneous infections, particularly in immunocompetent patients. The physiological and biochemical tests are not sufficiently sensitive and specific for the identification and differentiation of *Nocardia* spp. The number of species capable of causing disease on humans was underestimated when the identification was carried out using these methods. The identification and taxonomy of *Nocardia* spp has improved recently with molecular methods, such as sequencing of the subunit 16S rRNA and the gene *hsp65*.

OBJECTIVE: To make the molecular classification of the species and establish the genetic variability among the *Nocardia subspecies*, cultured from cutaneous, subcutaneous, lymphocutaneous infections and mycetomas by sequencing the subunit 16S rRNA and the gene *hsp65*.

METHOD: All the strains cultured of *Nocardia* spp., isolated from cutaneous, lymphocutaneous infections, and mycetomas were collected from January to December 2009, in the Hospital Dr. Manuel Gea González, Mexico City, and in the Dermatological Center Dr. Fernando Latapí. Mérida, Yucatán. The produces were amplified and purified, and sequencing was performed of the subunit 16S rRNA and of the gene *hsp65*. The nucleotide sequence was submitted to the GenBank database to look for homologies and define the species.

RESULTS: Nineteen strains were collected, excluding 2 of them due to their viability loss. Fourteen of the 17 strains sequenced were classified as *N. brasiliensis* (12 mycetomas, 2 nocardiosis), one as *N. takedensis*, and two as *N. harenae*. Sequencing of the subunit 16S rRNA showed slight genetic variability among the *N. brasiliensis species*; on the contrary, the *hsp65* sequence did not show any variability. One mixed infection with *N. brasiliensis* and *Mycobacterium mageritensis* was identified.

CONCLUSIONS: First study conducted in Mexico to sequence *Nocardia* in genes 16S rRNA and *hsp65*. The two first isolates of *N. harenae* from clinical samples were shown, as well as the first case in skin caused by *N. takedensis*. Also for the first time both species were sequenced with the gene *hsp65*. The molecular methods are vitally important in the identification of the *Nocardia species*.

1. INTRODUCCION

ANTECEDENTES

Genero *Nocardia*

El género *Nocardia* comprende bacterias filamentosas gram-positivas, aerobias, parcialmente ácido-alcohol resistentes con tendencia a fragmentarse en formas bacilares y cocoides (1). Son ubicuas en el ambiente y se encuentran distribuidas en todo el mundo (2) como componentes saprofitos del agua dulce y salada, suelo, polvo, depósitos vegetales y de materia fecal animal (3). Las especies del género *Nocardia* se han definido muy ampliamente por sus propiedades quimiotaxonómicas y tienen las siguientes características: compuesto peptidoglucano con *N*-acetilglucosamina y ácido meso diaminopimérico; fracción polisacárida de la pared con arabinosa y galactosa; patrón fosfolípido; perfil de ácidos grasos; ácidos micólicos y fracción de quinona isoprenoide. (4)

Epidemiología

La nocardiosis es una enfermedad cosmopolita, *Nocardia* spp., es aislada frecuentemente de muestras clínicas especialmente de pacientes inmunocomprometidos (5), en México origina el 2% de las micosis pulmonares (6). La infección cutánea primaria predomina en pacientes inmunocompetentes y no hay distribución geográfica definida; en países no tropicales se consideran más frecuentes *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova* y en naciones tropicales *N. brasiliensis*, *N. otitidis-caviarum* y *N. transvalensis* (6).

Cuadro Clínico

En humanos, se encuentran 6 formas básicas de enfermedades causadas por *Nocardia* spp. (7). Pulmonar (8), extrapulmonar, afectando ojo, hueso, articulaciones,

riñones (9) y sistema nervioso central (10); Las formas cutaneas y subcutaneas ocurre posterior a inoculación traumática de *Nocardia* spp., (11). *N. brasiliensis* es la más comúnmente involucrada causando enfermedades progresivas y *N. asteroides* puede ser más comúnmente identificadas en las lesiones que se autolimitan (12). Se puede diseminar desde el sitio de infección a ganglios linfáticos resultando en nocardiosis linfocutánea (13). Otra presentación clínica es el micetoma que son causados generalmente por actinomicetos, de los cuales la mayoría son ocasionados por *Nocardia* spp., principalmente por *N. brasiliensis* (14).

Métodos diagnósticos

Existen múltiples pruebas que se han utilizado como diagnósticas en enfermedades por *Nocardia* spp., entre ellas el examen directo (15), los cultivo bacteriológico, el cual requiere mínimo de 48 a 72 hrs para que las colonias sean evidentes y se debe mantener en incubación al menos 2 semanas para descartarlas, así como incubar en un ambiente húmedo para mantener la hidratación (16). Tradicionalmente las especies de *Nocardia* se distinguían unas de otras utilizando pruebas bioquímicas, como hidrólisis de caseína, de adenina, tirosina, xantina e hipoxantina, pero la mayoría de las especies no son reactivas, y estas no son de utilidad para identificar las subespecies. Se han examinado hidrolizados de pared celular para observar la presencia de ácido meso-diaminopimérico y de carbohidratos específicos, (17) cromatografía de gas-liquida de la cadena corta de ácidos grasos (18) y serología, la cual es poco específica (19).

Técnicas Moleculares

La disponibilidad de la secuenciación de diversos genes ha revolucionado la taxonomía del género *Nocardia* y se ha convertido en una herramienta invaluable para la identificación de las especies clínicas de este género. Este método proporciona una manera rápida y confiable en la identificación de la mayoría de las cepas de *Nocardia* (20).

El número distinto de *taxa* y de especies capaces de causar enfermedad humana fueron subestimados cuando la identificación se realizaba únicamente bajo las características fenotípicas (21).

La subunidad de la 16S rRNA es el más utilizado para la identificación de las especies, de hecho el banco de genes (*GenBank*), la base de datos pública más grande mantenida por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) contiene más de 90 000 secuencias de la subunidad 16S rRNA de numerosos géneros bacterianos (22). Para las especies de *Nocardia* la 16S rRNA es muy conservado y contiene regiones extensas que son idénticas para todas las especies al igual que regiones variables que son específicas para cada una de las especies. Como la secuenciación de la 16S rRNA es frecuentemente usada para identificación de las especies, las cepas aisladas con secuencias únicas de la subunidad 16S rRNA han sido designadas especies distintivas, resultando en un considerable aumento en el número de especies reconocidas de *Nocardia*. Se han utilizado las secuencias de otros genes con el fin de clasificar la especies de *Nocardia* spp., entre ellos la secuencia del gen *hsp65* (*heat shock protein*) el cual codifica para una proteína de la familia de las chaperonas con un peso de 65 KDa, esta proteína aumenta su expresión en altas temperaturas para evitar que diferentes proteínas asociadas a esta chaperona sean mal plegadas y posean su conformación correcta, asimismo se ha

demostrado tienen un polimorfismo suficiente para la identificación de distintas especies (23).

2. JUSTIFICACION

El aumento de pacientes inmunocomprometidos, como los trasplantados de órganos, ha llevado a un aumento en el número de infecciones oportunistas por *Nocardia*. A pesar que la nocardiosis se ha considerado como una enfermedad rara, reportes recientes indican que la incidencia de la infección está en aumento (24). *Nocardia* spp., causa un amplio rango de infecciones, ya mencionadas anteriormente. Se han descrito más de 80 especies y 33 se han implicado en enfermedad humana (1). Todas las especies patógenas pueden causar lesiones cutáneas y subcutáneas; sabemos que *N. brasiliensis* es la más comúnmente involucrada causando enfermedades progresivas y *N. asteroides* puede ser más comúnmente identificadas en las lesiones que se autolimitan (7). El aislamiento y determinación de las especies es importante para caracterizar las manifestaciones clínicas, predecir la susceptibilidad antimicrobiana e identificar las diferencias epidemiológicas (25).

La identificación de las especies puede ser un reto y un consumo enorme de tiempo utilizando cultivos de rutina y métodos quimiotaxonómicos. Muchas no reaccionan ante algunos de los métodos bioquímicos estándar utilizados en los laboratorios, como hidrólisis de caseína, de urea, producción de ácido a partir de ramnosa, alcalinización de citrato entre otras (8), y esto hace muy difícil la identificación de las especies (26).

Se han desarrollado herramientas de amplificación de ácidos nucleicos, para facilitar la determinación de especies (25). Recientemente la identificación y taxonomía de *Nocardia* spp., ha mejorado con métodos moleculares como el análisis de las secuencias de

la subunidad 16S rRNA y *hsp65* (16). Generalmente son procedimientos rápidos, precisos y reproducibles y pueden identificar de una mejor manera las especies de actinomicetos, en comparación con métodos fenotípicos (27). Hay pocos reportes de la aplicación de estos métodos para diagnóstico de infecciones cutáneas por *Nocardia* en laboratorios de microbiología clínica (28).

En la última década, como resultado de uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuencia de la subunidad 16S rRNA ha jugado un papel importante en la identificación de bacterias aisladas y el descubrimiento de nuevas bacterias en los laboratorios (29). Actualmente el análisis de secuencia de 16s rRNA es el método más utilizado para la identificación de especies y la definición de *Nocardia* se basa en la información filogenética molecular de la secuencia de este gen (25).

En el Hospital Dr. Manuel Gea González se han atendido varios casos de infecciones subcutáneas causada por *Nocardia* spp., tanto nocardiosis como micetoma, la detección de estos microorganismos se realiza mediante métodos bioquímicos y evaluación microscópica y macroscópica, determinando que el microorganismo causante es *Nocardia*, y en ciertas ocasiones se puede identificar la especie, pero es imposible identificar las subespecies. Clínicamente se comportan de manera distinta y responden diferente al tratamiento, debido a que el éxito terapéutico depende de la identificación del agente etiológico, de la elección adecuada del medicamento y de la sensibilidad del germen al mismo, por lo que es de gran importancia identificar las especies y las subespecies prevalentes, correlacionarlos con la clínica y establecer su sensibilidad farmacológica.

3. HIPOTESIS

La utilización de los genes 16S rRNA y *hsp65* permitirá identificar y observar variabilidad genética dentro de las diferentes especies y subespecies del género *Nocardia* asociadas infecciones cutáneas y subcutáneas.

4. OBJETIVOS

Clasificar molecularmente a las especies y establecer la variabilidad genética entre las subespecies de *Nocardia*, cultivadas de infecciones cutáneas, subcutáneas, linfocutáneas y micetomas aisladas en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y en El Centro Dermatológico “Dr. Fernando Latapí” mediante la secuenciación de la subunidad 16S rRNA y del gen *hsp65*.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Tipo de Estudio:

Descriptivo, abierto, observacional, prospectivo, retroproyectivo, transversal.

5.2. Ubicación Temporal y Espacial.

Servicio de Dermatología, Departamento de Micología y Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y Centro Dermatológico “Dr. Fernando Latapí”. Enero 2009 a Mayo 2010.

5.3. Criterios de Selección de la Muestra

Todas las cepas de *Nocardia* spp., cultivadas de infecciones cutáneas y subcutáneas, linfocutáneas y micetomas en el Departamento de Micología del Hospital General “Dr.

Manuel Gea González” y en el Centro Dermatológico “Fernando Latapí” de Mérida, Yucatán, que sean viables de enero a diciembre del año 2009.

5.4 Criterios de Eliminación

Todas las cepas de *Nocardia* spp., que dejen de ser viables a lo largo del estudio.

5.5 Métodos de Laboratorio

Cepas

Se recolectaron 19 cepas de *Nocardia* spp., las cuales fueron aisladas de infecciones cutáneas, linfocutáneas y micetomas de 15 pacientes del Centro Dermatológico “Dr. Fernando Latapí” y de 4 pacientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Las cepas fueron identificadas mediante examen directo con solución de Lugol y cultivo en agar dextrosa de Sabouraud.

Extracción de DNA

El cultivo fresco de cada aislamiento fue resuspendido en 200 µl de H₂O y centrifugado a 10,000 rpm por 5 min, el sobrenadante fue eliminado y a la pastilla se le agregó solución de lisis (550 µl), posteriormente se adicionó 250 µl de acetato de amonio y se mezcló por 5 min. Tras la homogenización, se colocó 500 µl de cloroformo isoamil-alcohol (24:1 w/w), se centrifugó a 10,000 rpm y se precipitó el ADN con etanol 100%, y el ADN fue lavado 2 veces con etanol al 70% y la pastilla se resuspendió en 100 µl de agua grado biología molecular estéril. (30, 31)

Amplificación de la subunidad 16S rRNA

La amplificación del gen de la subunidad 16S rRNA se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en este sentido se diseñaron los iniciadores (5'-ggatccttttgatcctggctcaggac-3' and 5'-acttgacgtcgtccccaccttcctc-3') utilizando la secuencia de la 16S rRNA de la cepa de *N. asteroides* ATCC 49872 (Numero de acceso: AY191251) para amplificar un producto de 1120 pb. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 96° C por 30 s, alineación a 70°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los productos de PCR se purificaron mediante el sistema comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, La Jolla, CA. USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. (30, 31)

Amplificación del gen *hsp65*

Se amplificaron 441 pb del gen *hsp65* utilizando los iniciadores (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') y (5'-CTTGTCGAACCGCATAACCCT-3') descritos por Steingrube et al., 1995. Las condiciones de amplificación fueron: amplificación inicial de 94°C por 5 min; amplificación 94°C por 1 min; alineación a 55°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min con 35 ciclos; por ultimo una desnaturalización final a 72°C por 10 min. De igual manera se procederá a purificar y secuenciar los productos amplificados. (30, 31)

Secuenciación de los genes

La secuencia de nucleótidos se determinó en ambas direcciones mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing, utilizando el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. La secuencia completa de nucleótidos se sometió a la base de datos del GenBank para buscar homologías mediante el sistema nucleotide Blast. Los porcentajes de similitud entre las secuencias se determinaron mediante el uso del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Análisis Filogenético

Para el análisis filogenético, todas las secuencias utilizadas en este estudio se ajustaron en la misma dirección. La alineación se realizó por medio del programa Vector NTI.

Se utilizó el programa Modeltest (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>, Posada & Crandall, 1998) para determinar el mejor modelo de evolución que se ajuste a los datos analizados. Los modelos de sustitución de nucleótidos escogidos fueron: Hasegawa-Kishino-Yano con sitios invariables (HKY+G) para las secuencias de *hsp65*, HKY+I+G para las secuencias del 16S y para ambos marcadores. Tiempo General Reversible con distribución gamma y sitios invariables (GTR+G+I). Con estos modelos de evolución se realizaron árboles filogenéticos en el programa Mr. Bayes versión 3.1.2 (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>, Holder & Lewis, 2003; Huelsenbeck *et al.*, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para la reconstrucción filogenética, se realizó el análisis para diez millones de generaciones, recolectando los árboles mejores soportados (valores de verosimilitud bajos) cada 100 generaciones, los árboles con soportes estadísticos bajos se descartaron y con los demás se realizaron un árbol de consenso de mayoría. Para la visualización gráfica de los árboles obtenidos se utilizó el programa TreeView

(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, 1996). Para similitud las diferencias genéticas entre especies se construyó una matriz de distancias de Kimura dos parámetros con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>) versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004) (32).

7. RESULTADOS

CEPAS

Se recolectaron 19 cepas de *Nocardia spp.* provenientes de distintas muestras clínicas, 15 de micetomas, 2 de nocardiosis linfangíticas y 2 de nocardiosis subcutáneas. Cuatro de las muestras fueron obtenidas de pacientes del Hospital general “Dr. Manuel Gea González y 15 de pacientes del Centro dermatológico “Dr. Fernando Latapí” de Mérida, Yucatán.

Tabla 1: Características demográficas y clínicas de los pacientes

| CEPA | SEXO/EDAD | OCUPACIÓN | TOPOGRAFIA | EVOLUCIÓN |
|--------|-----------|-------------|----------------------------------|-----------|
| 57-01 | M 12 | Estudiante | Codo izquierdo | 7 años |
| 332 | F 22 | Hogar | Tronco posterior | 3 años |
| 441 | F 61 | Hogar | Muslo y pierna derecho | 12 años |
| 170 | F 64 | Hogar | Tronco posterior. | 11 años |
| 18 | F 21 | Hogar/Campo | Escapula derecho. | 2 años |
| 86 | F 40 | Jardinero | Escapular izquierda. | 2 años |
| 136 | F 32 | Hogar | Periaxilar izquierda. | 8 años |
| 143 | M 38 | Seguridad | Periumbilical. | 1 años |
| 26 | M 46 | Campesino | Antecubital, antebrazo izquierdo | 10 años |
| 191 | M 66 | Campesino | Abdomen | 15 años |
| 03 | F 38 | Campesina | Cuello y tronco posterior | 7 años |
| 21 | M 34 | Empleado | Antecubital izquierda | 1 años |
| 17909 | F 16 | Estudiante | Abdomen , flanco izquierdo | 2 años |
| 189 | M 40 | Albañil | Abdomen | 2 años |
| 211 | M 33 | Albañil | Hemitórax izquierda. | 1 años |
| SYL | M31 | Músico | Codo izquierdo | 1 semana |
| 1510 a | M45 | Ingeniero | Mano y antebrazo derecho | 3 semanas |
| 1510b | M45 | Ingeniero | Mano y antebrazo derecho | 3 semanas |
| 245 | M41 | Lava coches | Brazo derecho | 10 años |

Se observaron las características fenotípicas de las colonias: 7 colonias de color blanco y aspecto de rocas, 3 colonias color blanco-naranja, 3 color blanco con tintes cafés,

5 color beige y una rosada. Del total de las muestras se excluyeron las cepas 136 y 191 debido a que se perdió la viabilidad de las colonias.

EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE PCR

Se realizó la extracción del ADN cromosomal de 19 cepas de *Nocardia spp*; el método de extracción de DNA cromosomal utilizado permitió observar la presencia de plásmidos en 2 cepas (cepa 170 y 21). Se excluyeron 2 debido a que no se logró la extracción. El ADN fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para determinar su pureza, concentración e integridad. Posteriormente la concentración de DNA fue determinada utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta de 260 nm y se utilizaron 200 ng de ADN para amplificar los genes 16S rRNA y *hsp65*.

SUBUNIDAD 16S rRNA

Mediante la PCR se amplificó un producto de 1120 pb de la subunidad 16S ribosomal de las 17 cepas que fueron viables, el producto fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración final de 10 mg/ml (Fig1.), el producto de amplificación fue purificado utilizando un sistema de columnas Qiaquick y secuenciado en ambos sentidos utilizando los mismos iniciadores de la PCR original. Una vez secuenciado el producto en ambos sentidos se obtuvo una secuencia consenso de nucleótidos y aminoácidos, la cual fue utilizada para buscar homologías en la base de datos del GeneBank mediante el sistema Blastn y Blastx.

Se observó una homología del 100% con *N. brasiliensis* en 14 de las 17 cepas (1510 a y b, 332, 170, 18, 17909, 143, 189, 86, 26, 245, SyL 5701 y 0308) asimismo una homología al 100% con *N. harenae* en 2 cepas (cepas 441 y 21) y homología al 100% con *N. takedensis* en 1 cepa (cepa 211).

Se observó una homología del 100% con *N. brasiliensis* en 14 de las 17 cepas (1510 a y b, 332, 170, 18, 17909, 143, 189, 86, 26, 245, SyL 5701 y 0308) así mismo homología al 100% con *N. harenae* en 2 cepas (cepas 441 y 21) y homología al 100% con *N. takedensis* en 1 cepa (cepa 211).

Sorpresivamente se logró amplificar la secuencia de la subunidad 16S ribosomal de *Mycobacterium mageritense*, quien se encontraba asociada a la cepas 5701 correspondiente a una de las cepas de *N. brasiliensis*.

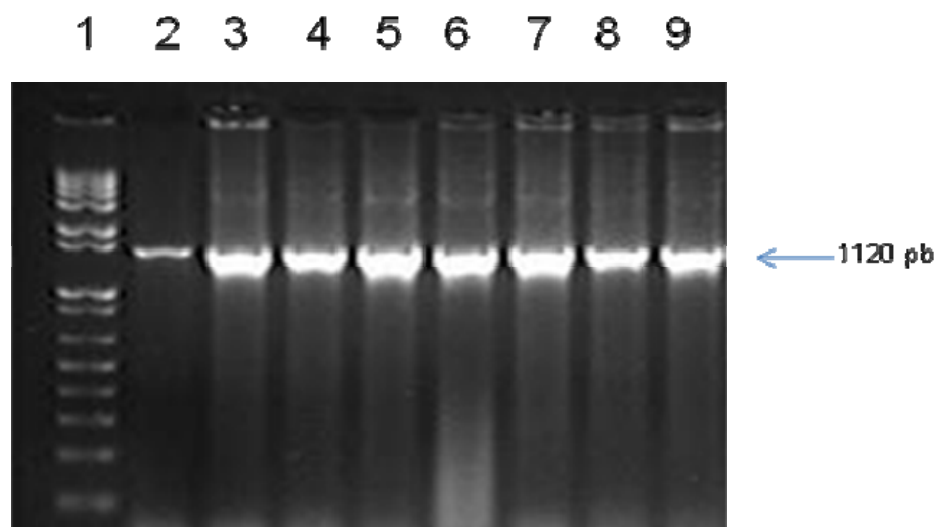


Fig 1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación de la subunidad 16S rRNA. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Carril 2-9. Muestras clínicas (18, 26, SyL, 86, 57-01, 143, 170, 189)

De la muestra clínica 1510 se obtuvieron 2 colonias (a y b) fenotípicamente distintas en el cultivo, una blanca y una naranja y al realizar la secuencia se obtuvo la misma cepa clasificada como *N. brasiliensis*. Las secuencias fueron sometidas a la base de datos del GeneBank bajos los números de acceso: HM852031, grp2937323

hsp65

Mediante PCR se amplificó un producto de 441 pb del gen *hsp65* el cual fue visualizado en un gel de agarosa 1% (Fig. 2) y el producto fue purificado con sistema comercial Qiaquick para ser posteriormente secuenciados en ambos sentidos utilizando los iniciadores de la PCR original.

Una vez secuenciado el producto en ambos sentidos se obtuvo una secuencia consenso de nucleótidos y aminoácidos, la cual fue utilizada para buscar homologías en la base de datos del GeneBank mediante el sistema Blastn y Blastx.

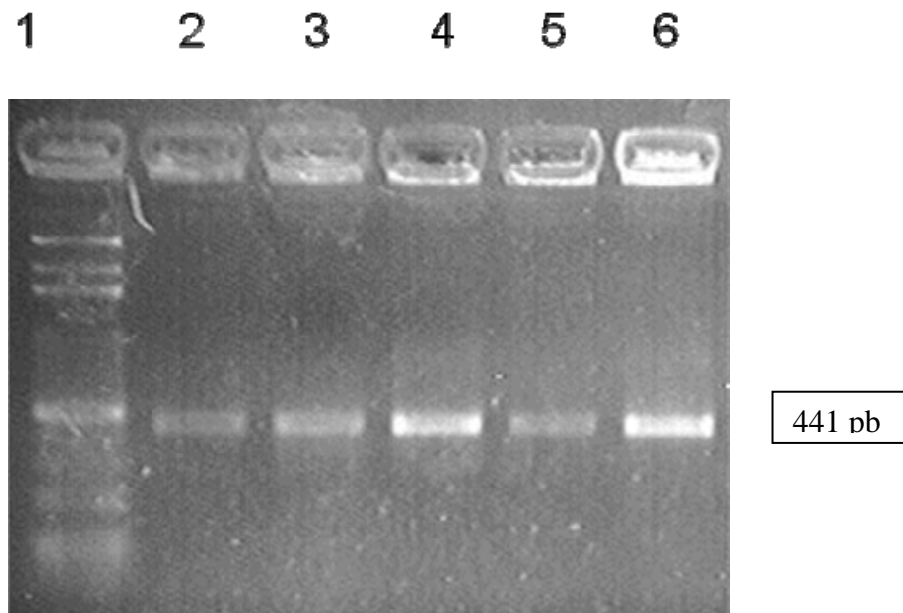


Fig 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación del gen *hsp65*. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb ladder. Carril 2-6. Muestras clínicas (18, 26, Syl, 86, 57 01)

Tabla 2: Relación entre la clasificación molecular y presentación clínica.

| CEPA | FENOTÍPICO | 16s rRNA | <i>hsp65</i> | MUESTRA CLÍNICA | ORIGEN |
|--------|-----------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------|
| 5701. | Beige | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 332. | Blanca con café | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 441. | Rosada | <i>N. harenae</i> | <i>N. harenae*</i> | Micetoma | CDFL |
| 170. | Naranja | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 18. | Beige | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 86. | Beige | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 136. | Beige | NA | NA | Micetoma | CDFL |
| 143. | Beige | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 26. | Naranja | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 191 | Blanca | NA | NA | Micetoma | CDFL |
| 0308. | Blanca | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 21 | Blanca | <i>N. harenae</i> | <i>N. harenae*</i> | Micetoma | CDFL |
| 17909. | Blanca con café | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Nocardiosis Subcutánea | CDFL |
| 189. | Blanco con café | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | CDFL |
| 211. | Blanca | <i>N. takedensis</i> | <i>N. takedensis*</i> | Micetoma | CDFL |
| SYL. | Blanca | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Nocardiosis | HGMGG |
| 1510 a | Naranja | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Nocardiosis Linfangítica | HGMGG |
| 1510b | Blanca | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Nocardiosis Linfangítica | HGMGG |
| 245 | Blanca | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | Micetoma | HGMGG |

HGMGG: Hospital General Dr. Manuel Gea González Distrito Federal

CDFL: Centro Dermatológico Dr. Fernando Latapí. Mérida

*Primera vez que se secuenció este gen

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN 16S rRNA

Los análisis de variación genética revelan que el gen 16S rRNA con 1120 pb presenta un 14% de sitios variables y 11% de sitios filogenéticamente informativos. Con esta información se realizó la reconstrucción filogenética de las especies de *Nocardia* utilizando 110 secuencias para la subunidad 16S rRNA obtenidas del *GenBank* y nos basamos en las secuencias filogenéticas más cercanas las cuales son: *N. brasiliensis* (AY245543), *N. brasiliensis* (EU645594), *N. brasiliensis* (AF430038), *N. brasiliensis* (GQ217498), *N.*

brasiliensis (X80591), *N. brasilensis* (X80608), *N. takedensis* (DQ840025), *N. harenae* (DQ282122) y *N. harenae* (GQ376170).

En el árbol filogenético se pueden identificar 3 clados o grupos estadísticamente bien definidos, el primero de ellos representado por *N. brasiliensis* con un valor de probabilidad del 100% y por las cepas analizadas en este trabajo (1510 a y b, 332, 170, 18, 17909, 143, 189, 86, 26, 245, SyL 5701 y 0308). Un segundo clado formado por cepas de *N. takedensis* con valor de probabilidad posterior de 100% y por la cepa 221 analizada en este trabajo. Un tercer clado formado por *N. harenae* y por las cepas 21 y 441 con valor de probabilidad posterior de 100% (Fig. 3).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN *hsp65*

Los análisis de variación genética revelan que el gen *hsp65* con 441 pb presenta un 26% de sitios variables y 20% de sitios filogenéticamente informativos. Con esta información se realizó la reconstrucción filogenética de las especies de *Nocardia* utilizando 70 secuencias de *hsp65* obtenidas del *GenBank*, basándonos en la secuencia filogenéticamente más cercana: *N. brasiliensis* (AY756516).

En el árbol filogenético se pueden identificar 1 clado o grupo estadísticamente bien definido, representado por *N. brasiliensis* con un valor de probabilidad del 100% y por las cepas analizadas en este trabajo. (332, 170, 18, 17909, 143, 189, 86, 26, 245, SyL, 5701, 0308). Un segundo clado formado por cepas de *N. takedensis* con valor de probabilidad posterior de 100% y por la cepa 211 analizada en este trabajo. Un tercer clado formado por *N. harenae* y por las cepas 21 y 441 con valor de probabilidad posterior de 100% (Fig. 4).

Al comparar las secuencias de nuestras cepas con las secuencias obtenidas del Genebank, se observó que las muestras analizadas en este estudio correspondientes a *N. brasiliensis* (332, 170, 18, 17909, 143, 189, 86, 26, 245, SyL, 5701, 0308) mostraron una homología del 100% tanto entre ellas como con las secuencias de la base de datos del Genebank, tanto para la subunidad 16S rRNA como para el gen *hsp65*. Las cepas correspondientes a *N. takedensis* y *N. harenae* mostraron una homología del 97% con respecto a la subunidad 16S rRNA (Tabla 3 y 4). En cuanto a las secuencias de *hsp65*, es imposible compararlas debido a que este estudio es el primero en el cual se secuencian este gen tanto en *N. takedensis* como *N. harenae*.

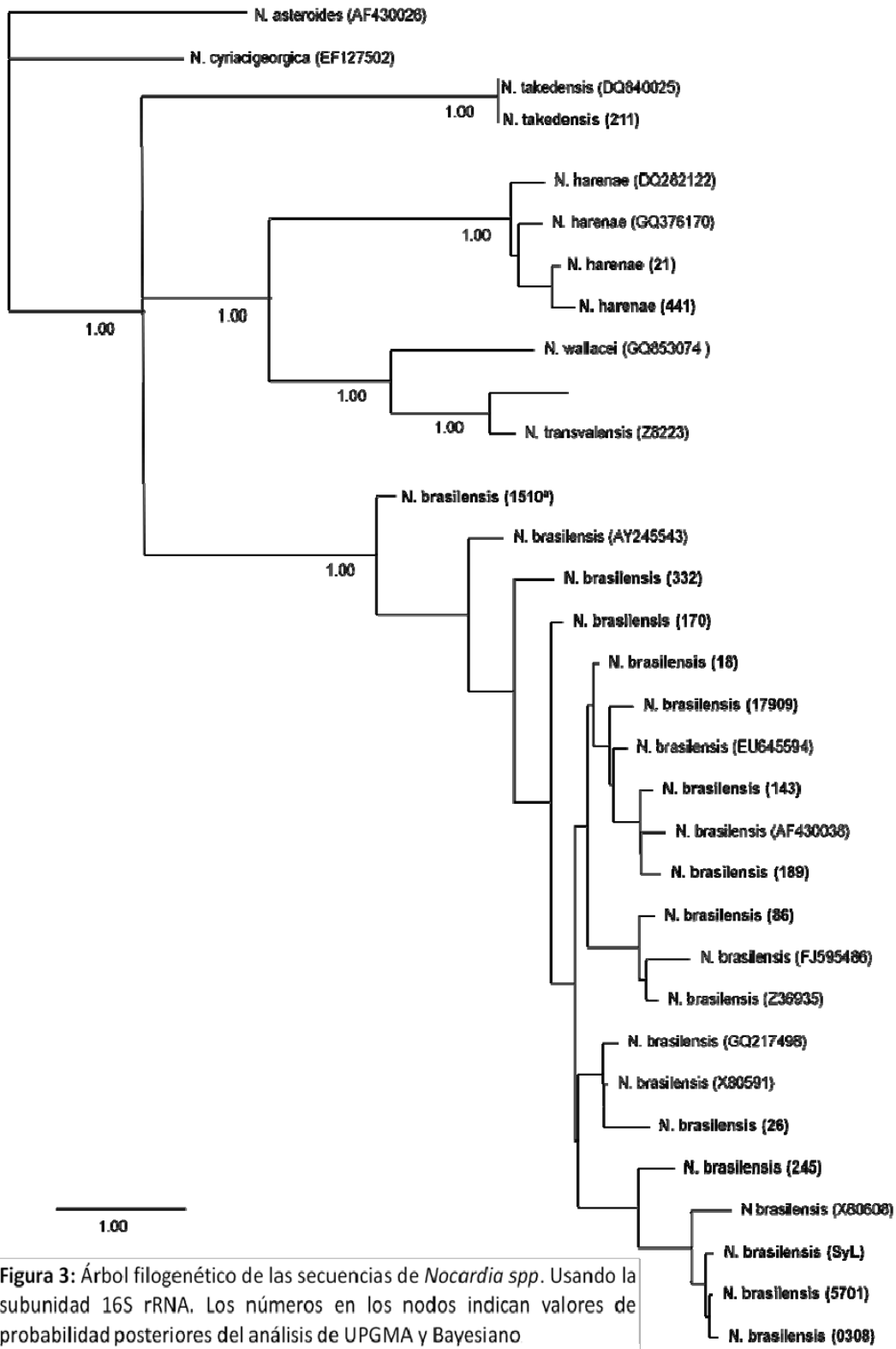


Figura 3: Árbol filogenético de las secuencias de *Nocardia* spp. Usando la subunidad 16S rRNA. Los números en los nodos indican valores de probabilidad posteriores del análisis de UPGMA y Bayesiano

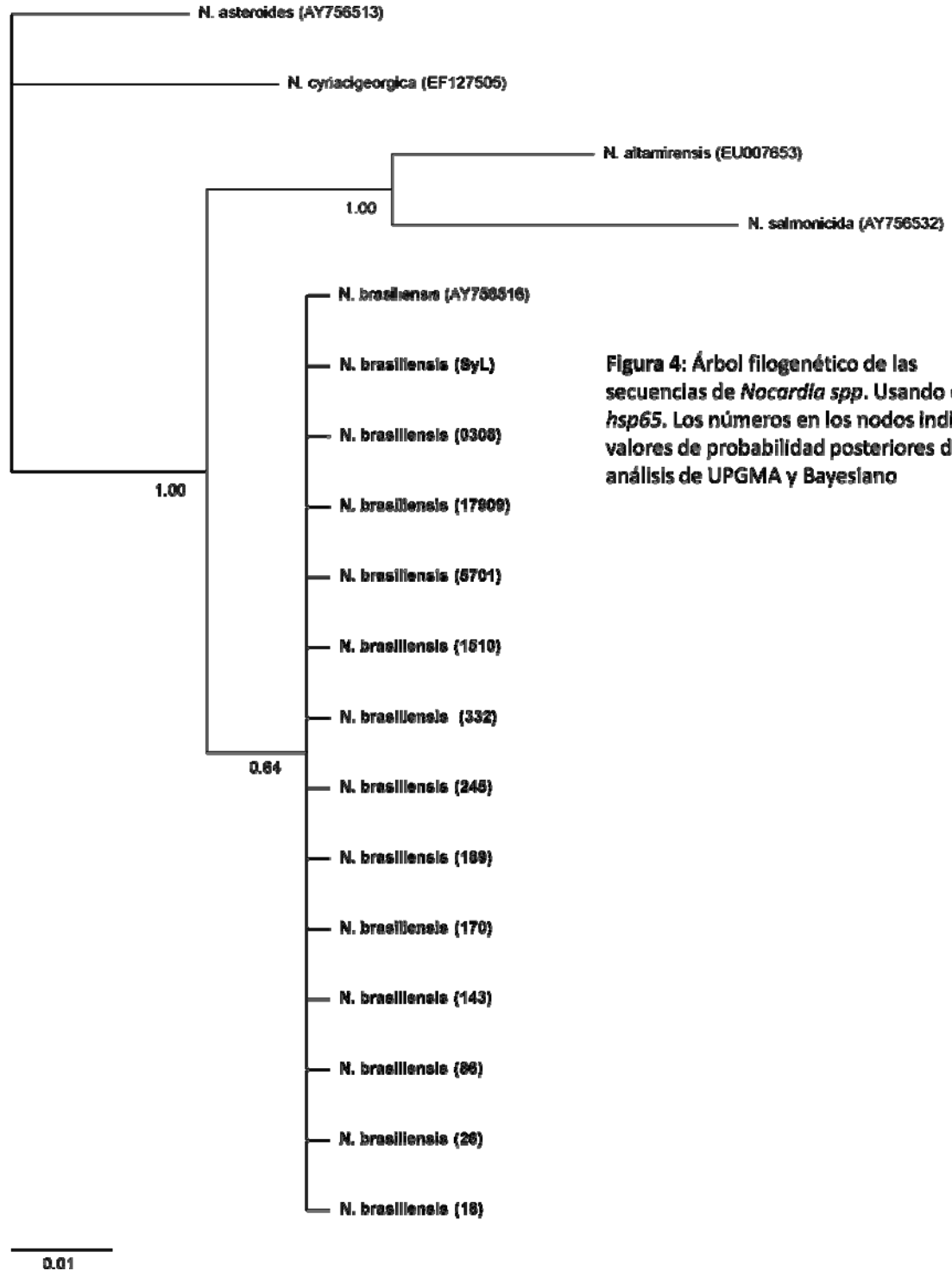


Figura 4: Árbol filogenético de las secuencias de *Nocardia* spp. Usando el gen *hsp65*. Los números en los nodos indican valores de probabilidad posteriores del análisis de UPGMA y Bayesiano

Tabla 4: Porcentaje de similitud nucleotídica entre secuencias del genero *Nocardia*.

| # | Especies | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|----|-------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | <i>N. asteroides</i> | | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 |
| 2 | <i>N. cyriacigeorgia</i> | 99 | | 97 | 97 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 | 98 |
| 3 | <i>N. hareanae</i> | - | - | | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 |
| 4 | <i>N. takedensis</i> | - | - | - | | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 | 97 |
| 5 | <i>N. brasiliensis</i> | 96 | 95 | - | - | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6 | <i>N. brasiliensis 18</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 7 | <i>N. brasiliensis 26</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 8 | <i>N. brasiliensis 86R</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 9 | <i>N. brasiliensis 143</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | <i>N. brasiliensis 170</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 11 | <i>N. brasiliensis 189</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 12 | <i>N. brasiliensis 245</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 13 | <i>N. brasiliensis 332</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 14 | <i>N. brasiliensis 1510</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 |
| 15 | <i>N. brasiliensis 5701</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 |
| 16 | <i>N. brasiliensis 17909</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | 100 |
| 17 | <i>N. brasiliensis 043143</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| 18 | <i>N. brasiliensis SyL</i> | 96 | 95 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Arriba de la diagonal secuencias de 16S, debajo de la diagonal secuencias de HSP65

8. DISCUSIÓN

A lo largo del tiempo se han utilizado múltiples métodos diagnósticos en la identificación de *Nocardia* spp. La observación de granos en el examen directo, es el primer paso en el abordaje del micetoma, pero en ciertos cuadros clínicos como las nocardiosis cutánea y linfocutánea están ausentes. El crecimiento en los cultivos de *Nocardia* toma entre 48 a 72 hrs, sin embargo es crucial esperar 14 días para descartarla. Se han utilizado otros métodos tanto bioquímicos (fenotípicos) y serológicos, los cuales además de ser poco específicos y poco sensibles pueden identificar las especies más no son útiles para diferenciar entre las subespecies. En 1990 Wallas y colaboradores describieron un nuevo abordaje para la clasificación del género y las especies de *Nocardia* (33). La disponibilidad de metodologías moleculares como la secuenciación de diversos genes ha revolucionado la taxonomía del género *Nocardia* y se ha convertido en una herramienta invaluable para la identificación de las especies y subespecies clínicas de este género. Su taxonomía ha sido revisada detalladamente durante la última década y se han reportado más de 80 especies, pero aún se encuentran varias especies no adecuadamente clasificadas.

En los últimos años se han realizado múltiples estudios utilizando métodos moleculares como la secuencia de la subunidad 16S ribosomal y del gen *hsp65*, con el fin de identificar diferentes especies de *Nocardia* spp.

Roth, Andrees, Kroppenstedt, y colaboradores en 2003, realizaron la secuencia de la subunidad 16S rRNA en 74 cepas representativas del género *Nocardia*, clasificadas en 25 especies, con el fin de proveer las bases moleculares para la identificación precisa de las especies y con el objetivo de reevaluar la taxonomía asignada a *N. asteroides*. En este estudio los autores confirman que la heterogeneidad de especies de *Nocardia* relacionadas es muy bajo. Cepas previamente clasificadas como *N. asteroides* se clasificaron en 5

nuevos grupos filogenéticos. (*N. asteroides sensu strictu*), *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. carnea* y *N. flavorosea*. (20). En 2007 Kageyama y Mikami aislaron 22 cepas de *Nocardia* de muestras clínicas, en Japón. Secuenciaron la 16S rRNA y detallaron las características bioquímicas de las cepas obtenidas. Los resultados obtenidos revelaron que 9 cepas debían ser reclasificadas en especies distintas a *N. asteroides sensu stricto*, y proponen 17 nuevas especies del genero *Nocardia* y reportan la primera infección causada por *N. beijingensis*, *N. transvalensis* y *N. pseudobrasiliensis* en Japón (34).

En el año 2005 Wauters y colaboradores, en 86 cepas de *Nocardia* aisladas de muestras clínicas, identificaron por secuenciación de la subunidad 16S rRNA: 83 cepas pertenecieron a solo 6 especies. 44% a *N. farcinica*, 22% a *N. nova*, 15% a *N. cyriacigeorgica*, 6.9 % *N. brasiliensis*, 5.8% *N. abscesus* y 2.3% *N. paucivorans* (35).

Al observar las características fenotípicas de las cepas, 7 colonias fueron blancas de aspecto rocoso compatibles con la macroscopia de *N. brasiliensis*, 3 cepas blanco-naranja compatibles con las características de las colonias de *N. asteroides*, el resto fueron café claro, rosadas, y beige este ultimo color se ha observado en las colonias de *Actinomadura madurae*. (6)

Nuestro estudio es el primer trabajo que clasifica molecularmente las especies de *Nocardia* en nuestro país; a diferencia de los estudios previos, en donde la mayoría de las cepas eran clasificadas como *N. asteroides*, en este estudio el 82.3% de las cepas analizadas mediante la secuencia de 16S rRNA fueron de *N. brasiliensis*, lo cual es compatible con la literatura en donde se menciona que en zonas tropicales, como en ciertas áreas de nuestro país, es mas prevalente; 12 provenían de micetomas y dos de nocardiosis. En dos casos de micetoma se obtuvieron 2 cepas clasificadas como *N. harenae* y una como *N. takedensis*.

Nocardia harenae fue descrita por primera vez en 2006 por Jae Pyo Seo y Soon Dong Lee en la Republica de Corea, fue aislada de la arena de la playa en las costas de la Isla de Jeju. Esta produce un sustrato naranja rojizo, un micelio aéreo blanco y se fragmentan en elementos cocoides. Basado en la secuencia de la subunidad 16S rRNA pertenece a la misma rama de que incluye *N. flavorosea*, *N. pigrifrangens*, *N. sienata* y *N. testácea*. No se han reportado casos clínicos asociados a esta especie. (36)

Nocardia takedensis fue aislada por primera vez en Japón en 2005 por Hideki Yamamura y colaboradores del sedimento del foso acuático que rodea Takeda Shrine en Yamanashi en Japón (37) y por Kayo Watanabe en un paciente de 75 años con diagnóstico de linfoma de células T (38). En 2009 A Betran y colaboradores reportaron el primer caso de nocardiosis pulmonar por *N. takadensis* en España (39). Es la primera vez que se aísla *N. takadensis* en México.

Al realizar la secuencia del 16S rRNA de la cepa 57 clasificada como *N. brasiliensis* se encontró la asociación con *Mycobacterium mageritense*. Esta micobacteria se ha aislado de infecciones pulmonares y cutáneas. (40) y se han reportado forunculosis asociadas a este microorganismo (41).

La cepas 1510 obtenida de una nocardiosis linfangítica, al sembrarla en medio Saburaud, se obtuvieron 2 colonias, una naranja y una blanca, al secuenciar la subunidad 16S ribosomal ambas (1510 a 1510b) fueron clasificadas como *N. brasiliensis*, siendo que de la misma muestra clínica se aislaron aparentemente 2 cepas de la misma especie, con características fenotípicas distintas.

Este estudio es el primero en secuenciar el gen *hsp65* de *N. takedensis* y *N. harenae*, por lo que fue imposible comparar su homología con otras cepas. En cuanto a la secuencia de este gen en las 14 cepas de *N. brasiliensis* no se encontró variabilidad genética entre ellas. Previamente se han realizado estudios de la secuencia del gen *hsp65*. Yin X y colaboradores, evaluaron el gen *hsp65* para detección e identificación de las especies de *Nocardia* pero de cepas aisladas de ojo. De 11 cepas de *Nocardia* se identificaron 6 especies: *N. arthritidis*, *N. neocaledoniensis*, *N. asiatica*, *N. asteroides tipo 4*, *N. brasiliensis*, y *N. pseudobrasiliensis*. Los autores concluyeron que la secuencia del gen *hsp65* es un método rápido y efectivo para identificar especies de *Nocardia*. (23)

Rodriguez-Nava et al., compararon una estrategia basada en secuencia utilizando el banco de datos de *hsp65* y el banco de datos de la 16S rRNA, concluyendo que la región de *hsp65* contiene polimorfismo suficiente para la identificación adecuada de las especies de *Nocardia*. Los autores proponen que combinando las secuencias de *hsp65* y de 16S rRNA pueden formar una base nueva para la identificación de *Nocardia*, particularmente si la secuencia de la 16S rRNA es similar entre las especies, pudiendo contribuir a un nuevo antecedente en la taxonomía. (42)

En este estudio no se logro identificar subespecies de *Nocardia* mediante la secuenciación de *hsp65*, debido a que únicamente se trabajo con un fragmento del gen y no con el gen completo debido a su tamaño, por lo que será necesario secuenciar el gen completo para poder saber si existe variabilidad genética.

9. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en donde se secuenciaron ambos genes, tanto 16S rRNA y *hsp65*, en especies de *Nocardia* en nuestro país.

La subunidad 16S rRNA continua siendo el estándar de oro en la identificación molecular de las especies de *Nocardia*, este estudio demostró variabilidad genética entre las especies de *N. brasiliensis*, la secuenciación del gen *hsp65* confirmó la identificación realizada con 16S rRNA y no demostró variabilidad entre las especies.

Con las herramientas moleculares empleadas en nuestro trabajo logramos determinar una infección mixta con *N. brasiliensis* y *M. mageritensis* al lograr amplificar ambas secuencias de las subunidad 16SA rRNA en la muestra clínica.

Este estudio confirma que la cepa más predominante en nuestro país es *N. brasiliensis* y que posee una heterogeneidad genética muy baja.

Recalamos la importancia de los métodos moleculares en cuanto a la clasificación de las especies, debido a que no encontramos una correlación entre la identificación molecular y la fenotípica.

En este estudio presentamos los 2 primeros casos de *N. harenae* aislados de muestras clínicas. Y el primer caso de *N. takedensis* aislada en piel. Es el primer estudio en secuenciar el gen *hsp65* en ambas especies.

10. PERSPECTIVAS

La utilización de métodos moleculares es una forma rápida y precisa de identificación microbiana por lo que es necesario contar con este tipo de pruebas de rutina en el diagnóstico clínico.

Es importante realizar estudios en donde se correlacionen los aspectos clínicos de las muestras con la identificación genética de las especies, y establecer si la heterogeneidad mínima que existe entre ellas se refleja en las manifestaciones clínicas. Asimismo es importante contar con estudios de resistencia antimicrobiana para tener un diagnóstico más completo y definitivo.

Es necesario secuenciar completamente el gen *hsp65* para confirmar o no si existe variabilidad genética entre los aislamientos.

Por último y al observar la presencia de plásmido en 2 de nuestras cepas es determinante conocer el contenido genético de este material extracromosomal ya se ha demostrado que estos plásmidos poseen genes de resistencia a diferentes quimioterapéuticos.

11. BIBLIOGRAFIA

- (1) Nand Lal Sharma, Vikram K Mahajan, Santwana Agarwal et al Nocardial mycetoma: Diverse clinical presentations. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:635-40
- (2) Josep Comellas, Micaela Morales ,Fernando Granell' Linfangitis nodular por *Nocardia asteroides*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 385-388
- (3) Saubolle, M.A, D Sussland. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J. Clin Microbiol*, 2003 41: 4497-4501
- (4) Michael M Mc. Neil, June M. Brown. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin Microbiol Rev* . 1994 7: 357-417
- (5) Kurup, P.V; H.S Randhawa, N.P. Gupta. Nocardiosis: a review. *Mycol. Appl* 1970 40:193-219
- (6) Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. México. McGraw-Hill 2008:127-48
- (7) Blaine L. Beaman, Lovelle Beaman. *Nocardia* Species: Host- Parasite Relationship. *Clin Microbiol Rev*. 1994. 7: 213-264
- (8) Bruno Guedes Baldi, Alfredo Nicodemos Cruz Santana, Teresa Yae Takagaki. Pulmonary and cutaneous nocardiosis in a patient treated with corticosteroids. *J Bras Pneumol*.2006;32 (6) 592-5
- (9) Boirin, P; F. provost, G. Chevrier, B. Dupont. Review of nocardial infection in France 1987 to 1990. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis* 1992; 11: 709- 714
- (10) Arroyo, J.C; S. Nichols, G.F. Carrol. 1977. Disseminated *Nocardia caviae* infection. *AM J. Med* 1977. 62: 409-412
- (11) Wilkerson, R.D; D.C Taylor, S.M. Opal, W.W Curl. *Nocardia asteroides* sepsis of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 1985, 197: 206-208
- (12) Anderson, C.G; J. Berger, S Lavie. *Nocardia brasiliensis* soft tissue infection in an immunocompromised host. *N.Y. state. J. Med* 1992; 92: 275-276
- (13) Belliveau, R.R; F. Geiger. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection simulating sporotrichosis. *West. J. Med*. 1977; 127: 245-246
- (14) Alteras, I; E.J Feuerman. The second case of mycetoma due to *Nocardia caviae* in Israel. *Mycopathologia*. 1986; 93:185-187
- (15) McNeil, M.M; J. Brown. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev*. 1994; 7:357-417
- (16) Barbara A. Brown- Elliott, June M. Brown et al. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 19: 259-282
- (17) Butler, W. R; J.O. Kilburn, G.P Kubica. High- performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol*. 1987. 25: 2126-2131
- (18) Mordarska, H; M. Mordarski, M. Goodfellow. Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol*. 1972. 71:77-86
- (19) Kjelstrom, J.A; B.L. Beaman. Development of a serologic panel for the recognition of nocardial infections in a murine model. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 1993. 16: 291-301.
- (20) Roth, A; S. Andrees, R.M. Kroppenstedt, D. Harmsen, H. Mauch. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S r RNA gene sequence reveals

- underspeciation and division of strains classified as *Nocardia* asteroids into three established species and two unnamed taxons. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41: 851-856.
- (21) Patel, J. B; R.J. Wallace, Jr; B.A. Brown Elliott et al. Sequence- based identification of aerobic actinomycetes. 2004. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2530-2540
 - (22) Clarridge, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology an infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 840-862
 - (23) Yin X, Liang S, Sun X, Luo S, Wang Z, Li R. Ocular nocardiosis: HSP65 gene sequencing for species identification of *Nocardia* spp. *Am J Ophthalmol.* 2007 Oct;144(4):570-3. Epub 2007 Aug 15
 - (24) Olga Portola, Ramón Guitart, Federic Gómez et al. Epidemiologia y manifestaciones clínicas de la infección por especies de *Nocardia* en Tarragona, 1997 a 2008: *Nocardia cyriacigeorgica* es un patógeno emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 doi:10.1016/j.eimc. 2009.02.008
 - (25) Farong Kong, Sharon C.A. Chen, Xiaoyou Chen et al. Assignment of Reference 5- end 16S rDNA Sequences and species- Specific Sequence Polymorphisms Improves Species Identification of *Nocardia*. *The open Microbiol J.* 2009, 3, 97-105
 - (26) Robert Schlaberg, Richard C. Huard, Phyllis Della-Latta. *Nocardia cyriacigeorgica*, an Emerging Pathogen in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2008 46:265-273
 - (27) Cloud, J. L; P.S. Conville, A. Croft, D. Harmsen, et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J. Clin. Microbiol.* 2004: 578-584
 - (28) Couble, A; V. Rodriguez- Nava, M.P de Montelos et al. Direct detection of *Nocardia* spp. In clinical samples by a rapid molecular method. *J. Clin. Microbiol.* 2005. 43:1921-1924
 - (29) Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Oct;14(10):908-34
 - (30) Ishikawa J, Chiba K, Kurita H, Satoh H .Contribution of *rpoB2* RNA polymerase beta subunit gene to rifampin resistance in *Nocardia* species.. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1342-6
 - (31) Steingrube VA, Brown BA, Gibson JL et al. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex., *J Clin Microbiol.* 1995 Dec;33(12):3096-101
 - (32) Sommerville W, Thiebert L, Schwartzman K and Behr MA. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J Clin Microbiol* 2005;43:2996-7
 - (33) Wallace, R. J., Jr., B. A. Brown, Z. Blacklock, R. Ulrich, K. Jost, J. M. Brown, M. M. McNeil, G. Onyi, V. A. Steingrube, and J. Gibson. 1995. New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* 33:1528–1533

- (34) Kageyama A, Mikami Y. Taxonomy and phylogenetic analysis of infectious *Nocardia* strains isolated from clinical samples. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2007;48(2):73-8
- (35) Georges Wauters, Véronique Avesani, Jacqueline Charlier, Distribution of *Nocardia* Species in Clinical Samples and Their Routine Rapid Identification in the Laboratory. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2624-8.
- (36) Jae Pyo Seo, Soon Dong Lee. *Nocardia harenae* sp. nov., an actinomycete isolated from beach sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006), 56, 2203–2207
- (37) Hideki Yamamura,¹ Masayuki Hayakawa,¹ Youji Nakagawa,¹ Tomohiko Tamura,² Tetsuro Kohno,³ Fumio Komatsu⁴ and Yuzuru Iimura. *Nocardia takedensis* sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2005), 55, 433–436
- (38) Kayo Watanabe, Masaaki Shinagawa, Masaru Amishima, Soji Iida, Katsukiyo Yazawa, Akiko Kageyama, Akikazu Ando, Yuzuru Mikami.”First Isolates of *Nocardia carnea*, *Nocardia elegans*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia puris* and *Nocardia takadensis* in Japan” *Jpn. J.Med. Mycol*. Vol. 47, 85-89, 2006 ISSN 0916-4804
- (39) A. Betraín, A. Rezusta, M. A. Lezcano, M. C. Villuendas, M. J. Reville, P. Boiron,² and V. Rodríguez-Nava. First Spanish Case of Nocardiosis Caused by *Nocardia takedensis*. *Journal of clinical Microbiology*, June 2009, p. 1918–1919 Vol. 47, No. 6
- (40) Appelgren P, Farnebo F, Dotevall L, Studahl M, Jönsson B, Petrini B. . Late-onset posttraumatic skin and soft-tissue infections caused by rapid-growing mycobacteria in tsunami survivors. Clin Infect Dis. 2008 Jul 15;47(2):e11-6
- (41) Gira AK, Reisenauer AH, Hammock L, Nadiminti U, Macy JT, Reeves A, Burnett C, Yakrus MA, Toney S, Jensen BJ, Blumberg HM, Caughman SW, Nolte FS. Furunculosis due to *Mycobacterium mageritense* associated with footbaths at a nail salon. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1813-7.
- (42) Rodríguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb;44(2):536-46.