



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Nocardia* spp.  
OBTENIDAS DE MUESTRAS CLÍNICAS, A PARTIR  
DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y SECUENCIACIÓN  
DE LA SUBUNIDAD 16S rRNA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MELISA MONTIEL ROBLES



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor:** Abel Gutiérrez Ramos

**VOCAL:**              **Profesor:** José Alexandro Bonifaz Trujillo

**SECRETARIO:**      **Profesor:** Misael González Ibarra

**1<sup>er</sup> SUPLENTE:**      **Profesor:** Alejandro Camacho Cruz

**2<sup>o</sup> SUPLENTE:**      **Profesora:** Ruth Edith Martín Fuentes

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

**ASESOR DEL TEMA:**

José Alexandro Bonifaz Trujillo

\_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Rigoberto Hernández Castro

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

Melisa Montiel Robles

\_\_\_\_\_

# ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVOS .....	5
HIPÓTESIS .....	5
ANTECEDENTES.....	6
Características del género <i>Nocardia</i> .....	6
Actinomicetoma.....	6
Nocardiosis .....	7
Diagnóstico de laboratorio.....	8
Susceptibilidad a antibióticos y tratamiento .....	9
MÉTODOS Y MATERIALES.....	11
Obtención de las cepas.....	11
Pruebas bioquímicas.....	11
Extracción y amplificación de DNA.....	11
Purificación y secuenciación de DNA .....	12
Análisis de secuencias .....	12
RESULTADOS .....	15
Identificación fenotípica .....	15
Identificación molecular .....	15
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES .....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
APÉNDICE A. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	36
Hidrólisis de xantina e hipoxantina, tirosina y caseína.....	36
Licuefacción de gelatina.....	38
APÉNDICE B. ALINEACIONES.....	39

## **JUSTIFICACIÓN**

México es el país con mayor número de casos de micetoma reportados en América y el segundo a nivel mundial (después de Sudán) [1,2]. El principal agente etiológico es *Nocardia* spp., este padecimiento ha sido clasificado recientemente por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida o neglecta, por lo que el diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado son de primordial importancia [1,3]. Por otro lado, en países donde las enfermedades crónicas pulmonares (en particular la tuberculosis) son frecuentes, los casos de nocardiosis pueden ser erróneamente diagnosticados. El éxito del tratamiento para ambos padecimientos depende de una identificación correcta de la especie, esto debido a que algunas especies de *Nocardia* presentan resistencia a antibióticos [4]. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones únicamente se reporta el género (*Nocardia* spp.) como consecuencia de que algunas cepas son difíciles de identificar por medio de métodos fenotípicos convencionales, entre los que se incluyen, pruebas tintoriales, de hidrólisis y de asimilación de algunos metabolitos, con base en los criterios de Gordon y Mihm [5,6].

Las técnicas moleculares han tenido un gran impacto en las últimas décadas en el laboratorio clínico microbiológico, ya que la identificación exacta de los microorganismos aislados es una de sus funciones más importantes [7]. La secuenciación del gen 16S rRNA, además de ser una técnica rápida, capaz de identificar la especie de cepas con características morfológicas y perfil bioquímico atípico, ha tenido un gran impacto en la taxonomía de *Nocardia* y en el descubrimiento de nuevas especies [5,8]. Con la aplicación de métodos moleculares para la identificación de *Nocardia* spp., han surgido distintas especies dentro del complejo *Nocardia asteroides*, el cual fue descrito por primera vez en 1988 al agrupar a las cepas de acuerdo a seis patrones de susceptibilidad antimicrobiana [7].

## **OBJETIVOS**

Identificar la especie de 26 cepas de *Nocardia* spp., obtenidas de muestras clínicas de pacientes con micetoma y nocardiosis, mediante métodos fenotípicos, observando la macromorfología y realizando cinco pruebas bioquímicas de rutina y mediante biología molecular, con la secuenciación del gen 16S rRNA.

Comparar la identificación fenotípica y molecular de las cepas con el fin de determinar ventajas y desventajas de su aplicación en el laboratorio clínico como método de diagnóstico.

## **HIPÓTESIS**

La determinación de la especie de las cepas de *Nocardia* spp., por medio de la secuenciación del gen 16S rRNA proporcionará una mayor exactitud en la identificación, permitiendo diferenciar a las especies dentro del complejo *Nocardia asteroides*.

## **ANTECEDENTES**

### **Características del género *Nocardia***

El género *Nocardia*, clasificado dentro de la familia *Nocardiaceae*, suborden *Corynebacterineae*, orden *Actinomycetales*, está compuesto por microorganismos procariontes aerobios, no móviles y capaces de formar estructuras filamentosas de diámetro menor a 1 µm (filamento microsifonado). Poseen una pared celular de peptidoglicano compuesta de ácido meso-diaminopimérico, arabinosa y galactosa, además de ceras y ácidos micólicos, por lo que son microorganismos Gram positivos y parcialmente ácido alcohol resistentes (AAR) [4,5,9]. Los actinomicetos crecen en temperaturas entre los 20 y los 45°C, degradan un gran rango de sustratos orgánicos y son capaces de metabolizar distintas fuentes de carbono y nitrógeno, lo que los convierte en microorganismos ubicuos, ya que se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats terrestres y acuáticos, como la tierra, vegetación en descomposición, espinas de acacias, madera y en agua dulce y salada, [4,5]. En la mayoría de las ocasiones, *Nocardia* spp. se presenta como saprófito de su hábitat, sin embargo, algunas especies pueden convertirse en patógenas oportunistas y primarias para los humanos, causando principalmente dos padecimientos que se abordarán a continuación, actinomicetoma y nocardiosis [4,5,9].

### **Actinomicetoma**

El micetoma es una infección subcutánea crónica, granulomatosa, asociada a una lesión traumática o de implantación por la que penetran los microorganismos a través de una solución de continuidad, clínicamente se presenta con aumento de volumen relativamente indoloro, deformación de la región afectada y lesiones de aspecto nodular, fistulizadas, de donde drena material seropurulento que contiene los granos (forma parasitaria) [1,10]. Es más frecuente en el género masculino en una relación 3:1 respecto al femenino, esto puede relacionarse con factores laborales y/o hormonales ya que en experimentos previos *in vivo* se ha demostrado que el estradiol limita el desarrollo del actinomicetoma [10,11]. Debido a que el micetoma es una enfermedad ocupacional, propia de campesinos (58.41%) y amas de casa de

zonas rurales (21.79%), la edad en la que predomina es entre los 16 y los 50 años ya que en este rango de edad se encuentran los grupos económicamente activos; además la ocupación también influye en la topografía clínica, principalmente afecta las extremidades inferiores (60.29%) y el tronco (19.76%), siendo esta muy particular de México [9,12].

El micetoma puede ser causado por hongos verdaderos y por actinomicetos, por lo cual es clasificado en eumicetoma y actinomicetoma, respectivamente. Esta enfermedad se presenta en zonas geográficas cercanas al trópico de Cáncer (cinturón del micetoma) y específicamente, el actinomicetoma causado por *Nocardia* spp. se presenta en regiones con clima subtropical, en donde existe alta humedad [1,10]. En México, los estados que cumplen con estas características climáticas y que poseen el mayor número de casos son, Jalisco, Morelos, Nuevo León, Guerrero, y Veracruz, donde el principal agente etiológico es *N. brasiliensis* con el 65.58% de los casos [1,10]. El diagnóstico diferencial incluye osteomielitis, tuberculosis colicuativa, esporotricosis micetomatoide, actinomicosis, botriomicosis y micobacteriosis no-tuberculosas [12].

### **Nocardiosis**

Es una enfermedad oportunista causada principalmente por *Nocardia asteroides* (sensu estricto) y *Nocardia farcinica*, adquirida por vía exógena a través de la inhalación de las formas cocoides, bacilares, esporas y fragmento de micelio del actinomiceto [13]. La forma clínica más frecuente es la pulmonar, ésta se presenta como una enfermedad aguda o crónica, el síntoma que predomina es tos y los pacientes producen expectoración espesa y mucopurulenta, también puede presentarse fiebre, pérdida de peso y malestares similares a los de otras enfermedades micobacterianas no tuberculosas [5,13]. Es una enfermedad más frecuente en hombres que en mujeres, con una relación 3:1 y el rango de edad con mayor susceptibilidad es de los 30 a los 60 años, la mayoría de los casos están asociados a individuos inmunocomprometidos, especialmente pacientes con leucemia, linfoma u otras neoplasias. En los últimos años, el número de casos reportados ha aumentado,



lo que puede ser consecuencia de las mejoras en los métodos diagnósticos y a la mayor sospecha clínica, además del incremento en la prevalencia de pacientes inmunosuprimidos [14]. La nocardiosis es cosmopolita y puede confundirse fácilmente con otras enfermedades, por lo que el diagnóstico diferencial incluye tuberculosis pulmonar, neumonías bacterianas, coccidioidomicosis, histoplasmosis, criptococosis, candidosis, y aspergilosis [5, 13].

### **Diagnóstico de laboratorio**

Para el diagnóstico de laboratorio es necesario realizar primero una evaluación microscópica y macroscópica, la observación microscópica es útil para determinar la presencia o ausencia de granos (micetoma) y filamentos microsifonados Gram positivos (nocardiosis) en muestras clínicas, y para la evaluación macroscópica se realizan cultivos que requieren de 8 a 15 días en promedio para que la morfología de las colonias sea evidente [5,13]. La identificación de especies de *Nocardia* se ha realizado tradicionalmente con pruebas bioquímicas, entre las que se encuentran hidrólisis de caseína, xantina, hipoxantina, tirosina y adenina y licuefacción de gelatina cuyo objetivo es determinar la capacidad de los actinomicetos de producir enzimas proteolíticas que muestran cambios característicos debido a los productos de degradación [5,15,16]. Sin embargo, debido a que las pruebas bioquímicas pueden tomar varias semanas, a la irrelevante información que se puede obtener de éstas por el comportamiento bioquímico de algunas especies y a que el número de especies descritas ha aumentado, se han desarrollado métodos moleculares principalmente para la identificación de especies clínicamente relevantes [4,5].

Los ribosomas son funcionalmente moléculas constantes y ubicuas que han sido consideradas cronómetros moleculares debido a que la estructura primaria de las dos principales subunidades rRNA 16S y 23S, constituyen una combinación particular de regiones conservadas, variables e hipervariables [5,8,17]. El gen 16S rRNA es el más ampliamente utilizado para la identificación de especies de un gran número de bacterias y, además como marcador

taxonómico siendo el más adecuado para relacionar filogenéticamente a los microorganismos, cuyas secuencias han sido compiladas en grandes bases de datos como el GenBank soportado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y que contiene aproximadamente 90,000 secuencias, [8,18]. Este gen está compuesto por 1500 nucleótidos y contiene nueve regiones hipervariables (V1-V9) que muestran una considerable diversidad entre las secuencias de diferentes especies de bacterias, las regiones V1-V3 son las de mayor utilidad en la identificación de especies ya que en las otras regiones existe un alto grado de conservación en las secuencias [19,20].

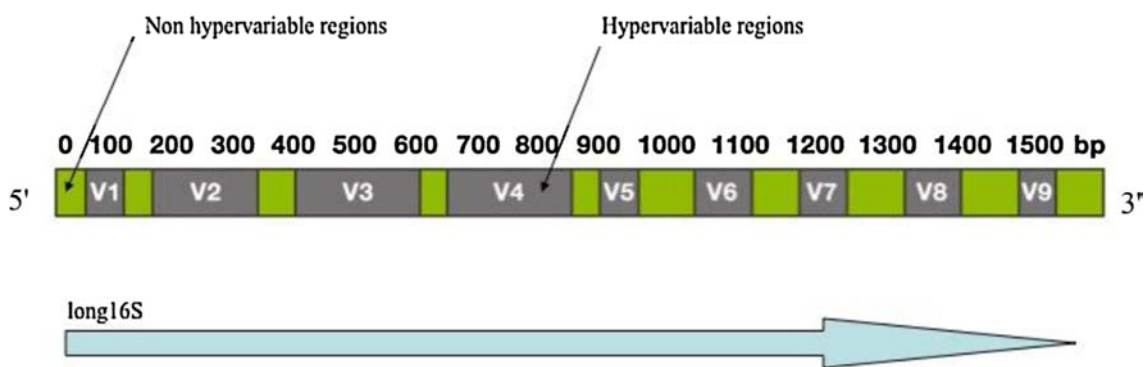


Figura 1. Regiones hipervariables del gen 16S rRNA (tomada de Renvoisé A., *et.al.*, 2003)

La secuenciación del gen 16S rRNA para el género *Nocardia* resulta ser muy útil ya que contiene amplias regiones que son idénticas para todas las especies y regiones variables que son especie específicas, además esta técnica posee la ventaja de reducir el tiempo de identificación de especie de microorganismos de lento crecimiento como *Nocardia*, y su alta especificidad disminuye la probabilidad de error [5,7].

### Susceptibilidad a antibióticos y tratamiento

Se han realizado diversos estudios sobre los patrones de sensibilidad del género *Nocardia* a antibióticos tanto con objetivos clínicos como taxonómicos. El complejo *Nocardia asteroides* fue propuesto por primera vez en 1988 por Wallace y colaboradores al reportar seis patrones de sensibilidad a antibióticos en los que se agrupan cepas identificadas bioquímicamente como *N. asteroides*, tiempo después con la aplicación de métodos moleculares, se

identificaron diferentes especies dentro de estos seis patrones de antibióticos [5,21]. Los antibióticos recomendados para realizar un estudio de susceptibilidad son amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ceftriaxona, ciprofloxacino, claritromicina, imipenem, linezolid, minociclina, tobramicina y sulfametoxazol/trimetoprim [5].

De forma general, *Nocardiae* es sensible a aminoglucósidos, sulfonamidas y tetraciclinas. Las sulfonamidas, específicamente la combinación de sulfametoxazol/trimetoprim son el tratamiento de elección para actinomicetoma y nocardiosis, estos antibióticos son muy efectivos contra *N. brasiliensis* y el complejo *N. asteroides* pero se ha demostrado de forma *in vitro* que su efectividad disminuye ante otras especies [4,14].

## **MÉTODOS Y MATERIALES**

### **Obtención de las cepas**

Se realizó el primo aislamiento de las cepas a partir de muestras clínicas, previo análisis microscópico en el que se observaron granos (micetoma), y filamentos microsifonados Gram positivos (nocardiosis), en agar dextrosa Sabouraud, incubándose a 28°C por aproximadamente 15 días. En caso de desarrollarse algún microorganismo contaminante, se utilizó agar dextrosa Sabouraud con antibióticos (Mycosel) para aislar la colonia de interés.

### **Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron hidrólisis de caseína, tirosina, xantina e hipoxantina (degradación) y licuefacción de gelatina. Para las pruebas de hidrólisis, las cepas fueron sembradas colocando un inóculo abundante en placas con el medio correspondiente e incubándose a 28°C durante 2 semanas para hidrólisis de caseína y durante 3 semanas para hidrólisis de tirosina, xantina e hipoxantina. La licuefacción de gelatina se realizó en tubos de ensayo con medio de gelatina nutriente para punción, inoculando de forma abundante e incubándose a 28 °C durante 2 semanas. Ver Apéndice A.

### **Extracción y amplificación de DNA**

La extracción de DNA fue realizada utilizando el sistema comercial DNeasy (Qiagen, La Jolla, CA. USA). La amplificación del gen de la subunidad 16S rRNA se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores, (5'-ggatccttttgatcctggctcaggac-3' y 5'-acttgacgtcgtccccaccttctc-3') diseñados a partir de la secuencia de la 16S rRNA de la cepa de *N. asteroides* ATCC 49872 (Número de acceso: AY191251) para amplificar un producto de 1109 pb. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 33 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 s, alineación a 69°C por 45 s y extensión a 72°C por 1 min 30 s, y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min.

Por otro lado, se utilizaron los iniciadores 16S universales para bacterias Gram positivas y Gram negativas (5'-agaggttgatcmtggctcag-3' y 5'-tacggytaccttggttacgactt-3') (Lane, 1991) para amplificar un producto de 1200 pb. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron, un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 s, alineación a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min 30 s, y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes fueron digitalizadas con el fotodocumentador GelLogic 2000.

### **Purificación y secuenciación de DNA**

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. Finalmente el DNA purificado de cada cepa fue secuenciado en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

### **Análisis de secuencias**

Las secuencias fueron editadas en el programa BioEdit para después ser ingresadas en la base de datos GenBank del NCBI, utilizando Nucleotide BLAST para buscar homologías. Se determinó la especie seleccionando la secuencia que presentó un mayor porcentaje de identidad, menor valor E y mayor porcentaje de cobertura, en ese orden de prioridad [22].

Se descargaron 42 secuencias de especies de *Nocardia* de la subunidad 16S rRNA de la base de datos GenBank, los nombres de las cepas y los números de acceso se presentan en la tabla 1. Posteriormente, para observar las diferencias de nucleótidos entre las secuencias analizadas, se realizaron 3 alineaciones en el software Vector NTI, utilizando el programa ClustalW.

La 1ª alineación fue entre las 24 secuencias de las cepas identificadas como *N. brasiliensis* (712-06, 024-14, 1311-09, 218-10, 860-10, 2074-09, 822-11, 860-11, 1425-11, 695-12, 1827-12, 040-13, 153-13, 1036-13, 790-13, 1077-13, 1465-13, 1531-13, 257-10, 685-10, 1183-12, 407-13, 407-13 y C-02) y la secuencia *N. brasiliensis* ATCC 700358 (referencia), la 2ª alineación se realizó con la secuencia de la cepa C-01 y las secuencias de *N. farcinica* PCM 2712 (referencia), *N. farcinica* 7400458, *N. farcinica* IFM 11285, *N. farcinica* ATCC 3318, *N. farcinica* Noc12 y *N. farcinica* SD1819. Para la 3ª alineación fueron incluidas la secuencia de la cepa C-03 y las secuencias de *N. mexicana* OFN 704 (referencia), *N. mexicana* PCH16S-019, *N. mexicana* DMS 44952 y *N. mexicana* S/N. Ver Apéndice B.

Tabla 1. Números de acceso de las secuencias descargadas del GenBank.

Cepa	Número de acceso	Cepa	Número de acceso
<i>N. abscessus</i> ATCC BAA-279	NR_117347	<i>N. harenae</i> 21	JF264836
<i>N. altamirensis</i> DSM 44997	NR_044366	<i>N. iowensis</i> NRRL 5646	NR_113923
<i>N. aobensis</i> IFM 0372	NR_040995	<i>N. lijiangensis</i> 13674F	EU741224
<i>N. araoensis</i> DSM 44729	NR_118199	<i>N. mexicana</i> OFN 704	AY360656
<i>N. artemisiae</i> YIM 65623	NR_108787	<i>N. mexicana</i> PCH16S-019	JN562392
<i>N. asiatica</i> NMS 102	AB820725	<i>N. mexicana</i> DMS 44952	NR_118203
<i>N. asteroides</i> ATCC 19247	NR_117315	<i>N. mexicana</i> S/N	NR_117332
<i>N. beijingensis</i> DSM 44636	NR_118618	<i>N. nova</i> LABAC SBP72a/12	KJ696704
<i>N. brasiliensis</i> ATCC 700358	NR_074743	<i>N. otitidiscaviarum</i> ATCC 14629	NR_117844
<i>N. concava</i> DSM 44804	NR_115958	<i>N. paucivorans</i> ATCC BAA-278	NR_117341
<i>N. crassostrae</i> S/N	NCU92800	<i>N. pseudobrasiliensis</i> ATCC 51512	NR_119184
<i>N. cyriacigeorgica</i> GR-22D	KF205245	<i>N. takedenis</i> DSM 44801	NR_118210
<i>N. elegans</i> DSM 44890	DQ639905	<i>N. tenerifensis</i> NEA30	JQ627388
<i>N. exalbida</i> X0078	GU233955	<i>N. thailandica</i> IFM 10145	NR_040994
<i>N. farcinica</i> PCM 2712	KC478709	<i>N. thraciensis</i> A2019	NR_109057
<i>N. farcinica</i> 7400458	EU861514	<i>N. transvalensis</i> ATCC 6865	NR_115840
<i>N. farcinica</i> IFM 11258	AB638765	<i>N. vaccinii</i> ATCC 11092T	NR_115841
<i>N. farcinica</i> ATCC 3318	NR_115831	<i>N. vinacea</i> JCM 10988	NR_115843
<i>N. farcinica</i> Noc12	HM357455	<i>N. wallacei</i> ATCC 49873	NR_044401
<i>N. farcinica</i> SD1819	AY640113	<i>N. xishanensis</i> W9867	NR_117391
<i>N. gamkensis</i> W9743	NR_117399	<i>N. yamanashiensis</i> W8187	NR_117395

Finalmente, se alinearon un total de 60 secuencias de *Nocardia* spp. en el software Vector NTI, utilizando el programa ClustalW, incluyendo las 26 secuencias de las cepas estudiadas y 34 secuencias de especies representativas de *Nocardia* descargadas de la base de datos GenBank, para generar un árbol filogenético bajo los siguientes parámetros: Multiple alignment, Gap opening penalty: 15, Gap extensión penalty: 6.66, Gap separation penalty range: 8, No end gap separation penalty, % identity for alignment delay: 40 y utilizando la corrección de Kimura. El árbol filogenético fue visualizado de forma gráfica en el programa TreeView como cladograma rectangular y como filograma.

## **RESULTADOS**

Se aislaron 26 cepas de *Nocardia* spp., a partir de muestras clínicas a las cuales les fue realizado un análisis microscópico (Figura 3), 25 de ellas de pacientes con micetoma y 1 de paciente con nocardiosis pulmonar. De éstas, 18 provienen del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", 4 del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua", 3 del cepario de la Facultad de Química, UNAM y 1 del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" (Tabla 2).

### **Identificación fenotípica**

Se observaron las características morfológicas de las cepas, encontrándose 12 cepas blancas, 11 beige, 1 beige-anaranjada y 1 beige-amarilla de tamaño limitado, secas, de consistencia dura y forma surcada o acuminada, 1 cepa anaranjada de tamaño limitado, seca, de consistencia suave y forma surcada y 1 cepa blanca de tamaño limitado, seca, de consistencia dura y aspecto "yesoso" (Figura 4).

Las pruebas bioquímicas realizadas a las 26 cepas fueron hidrolisis de caseína (Figura 5), tirosina, xantina e hipoxantina y licuefacción de gelatina, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 3.

### **Identificación molecular**

Se extrajo DNA cromosomal de las 26 cepas y se realizó PCR, amplificando productos de 1109 y 1200 pb (Figuras 6 y 7), se obtuvo el DNA purificado y la secuencia consenso para cada una de las cepas, las cuales fueron ingresadas a la base de datos GenBank, utilizando Blastnucleotide para buscar homologías.



Tabla 2. Datos clínicos de los pacientes.

No./ID	Género	Edad	Ocupación	Procedencia	Topografía	Evolución	Origen <sup>a</sup>
712-06	M	17	Albañil	Morelos	Pie-Tobillo der.	1a	HGM
024-09	M	50	Albañil	Morelos	Pierna izq.	5a6m	HGM
1311-09	M	35	Consejero	Sonora	Espalda	8a	HGM
218-10	M	12	Campesino/Estudiante	Michoacán	Pie izq.	4a	HGM
860-10	M	29	Herrero	Veracruz	Pierna der.	4a	HGM
2074-10	M	59	Campesino	Veracruz	Tórax anterior	15a	HGM
822-11	F	30	Campesino	Michoacán	Pierna izq.	10m	HGM
860-11	M	33	Empleado	Morelos	Pierna-ingle der.	4a6m	HGM
1425-11	M	65	Campesino	Morelos	Muslo izq.	30a	HGM
695-12	M	37	Campesino	Guerrero	Pierna izq.	6a	HGM
1827-12	M	70	Campesino	Oaxaca	Pie der.	1a	HGM
040-13	M	24	Campesino	Tabasco	Espalda	6a	HGM
153-13	M	22	Campesino/Mesero	Hidalgo	Pie izq.	2a	HGM
1036-13	F	17	Estudiante	Veracruz	Abdomen	4a	HGM
790-13	F	24	Ama de casa	Edo. de México	Zona perianal	2a	HGM
1077-13	M	40	Campesino	Hidalgo	Pierna-rodilla izq.	15a	HGM
1465-13	M	12	Estudiante	Guerrero	Tórax anterior	8m	HGM
1531-13	M	35	Campesino	Guerrero	Pierna izq.	4a	HGM
257-10	M	68	Campesino	Veracruz	Tobillo izq.	2a	CDLP
685-10	M	23	Campesino	Hidalgo	Tórax posterior	5a	CDLP
1183-12	M	32	Campesino	Morelos	Muslo y pie der.	1a	CDLP
407-13	M	37	Mantenimiento de alberca	Morelos	Hemitórax izq.	8a	CDLP
C-01	M	32	Obrero	Distrito Federal	Neumonía bilateral	2m	UNAMFQ
C-02	M	28	Campesino	Morelos	Pie der.	6m	UNAMFQ
C-03	M	35	Campesino/Pescador	Guerrero	Región Clavicular	1a	UNAMFQ
134-14	F	82	Ama de casa	Edo. de México	Antebrazo der.	ND <sup>a</sup>	HGMGG

<sup>a</sup>Abreviaturas: ND: No determinado, HGM: Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", CDLP: Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua", UNAMFQ: Cepario de la Facultad de Química, UNAM, HGMGG: Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

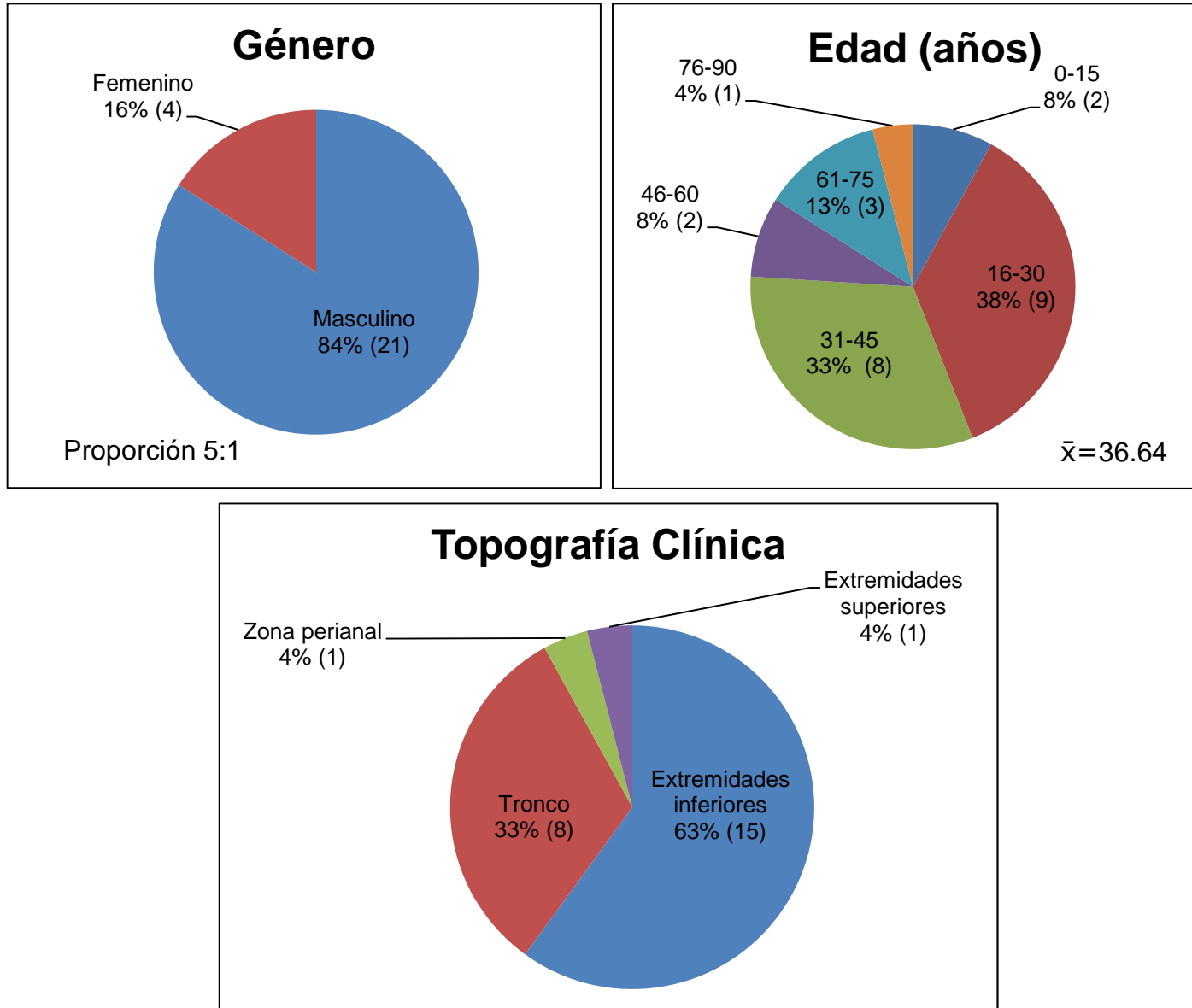
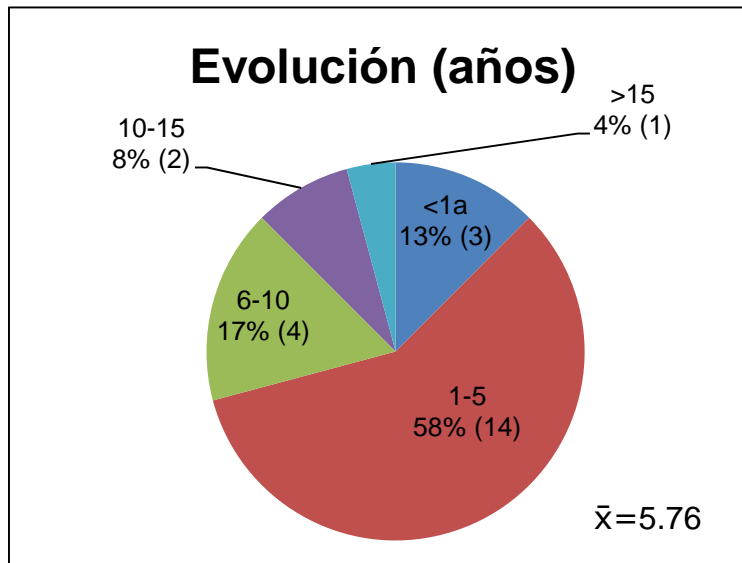
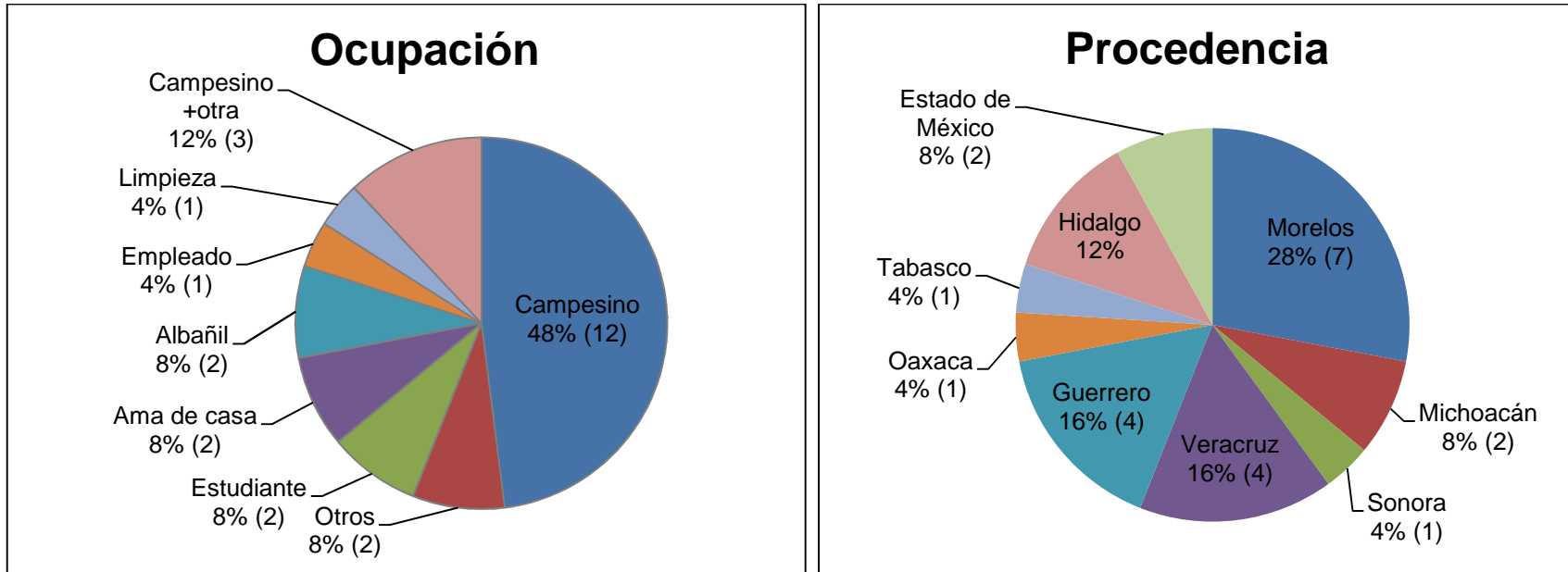


Figura 2. Epidemiología de pacientes con micetoma.



Cont. Figura 2. Epidemiología de los pacientes con micetoma.

Tabla 3. Morfología macroscópica y pruebas bioquímicas<sup>a</sup>.

No./ID	Morfología macroscópica	Caseína	Xantina	Hipoxantina	Gelatina	Tirosina	Especie <sup>b</sup>
712-06	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
024-09	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
1311-09	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
218-10	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
860-10	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
2074-10	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
822-11	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
860-11	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
1425-11	Beige/Anaranjada	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
695-12	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
1827-12	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
040-13	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
153-13	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
1036-13	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
790-13	Beige	+ <sup>d</sup>	-	-	+ <sup>d</sup>	+	<i>N. brasiliensis</i>
1077-13	Beige	+ <sup>d</sup>	-	-	+ <sup>d</sup>	+	<i>N. brasiliensis</i>
1465-13	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
1531-13	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
257-10	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
685-10	Beige/Amarilla	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
1183-12	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
407-13	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
C-01	Anaranjada	-	-	-	-	-	<i>N. asteroides</i>
C-02	Beige	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>
C-03	Blanca	-	-	+	-	-	<i>N. otitidiscaviarum</i>
134-14	Blanca	+	-	-	+	+	<i>N. brasiliensis</i>

<sup>a</sup>Símbolos y abreviaturas: - negativo, + positivo, +<sup>d</sup> reacción débil (hidrólisis posterior a un mes de incubación).

<sup>b</sup>La asignación de la especie está basada en Brown-Elliot BA, *et.al*,2006.

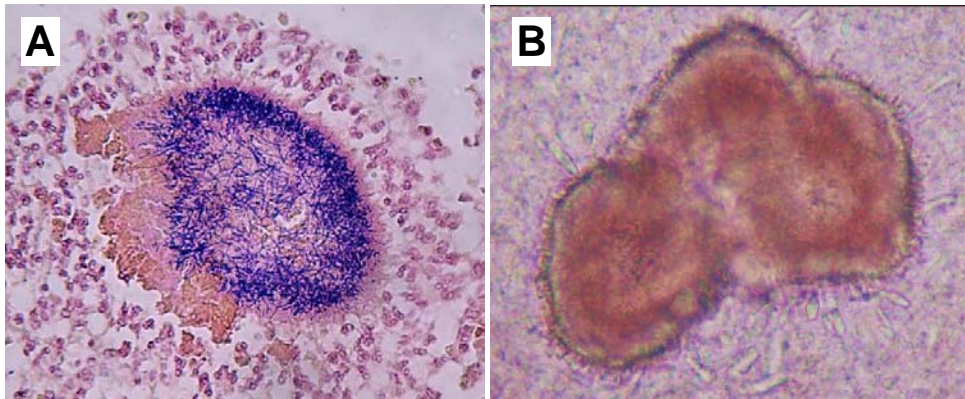


Figura 3. Granos de *Nocardia* spp. A: grano con tinción de Gram (40X), B: grano teñido con lugol (40X).

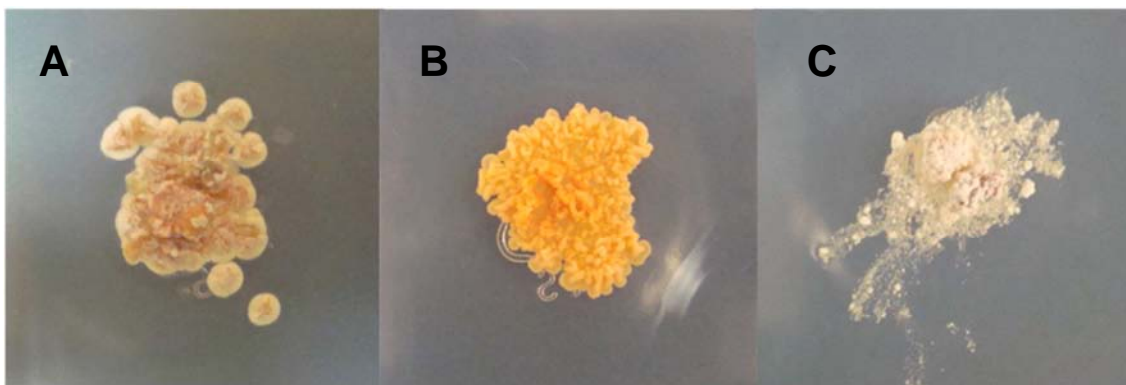


Figura 4. Macromorfología de cepas. A: colonia beige de tamaño limitado, seca, de consistencia dura y forma surcada o acuminada, B: colonia anaranjada de tamaño limitado, seca, de consistencia suave y forma surcada, C: colonia blanca de tamaño limitado, seca, de consistencia dura y aspecto “yesoso”.

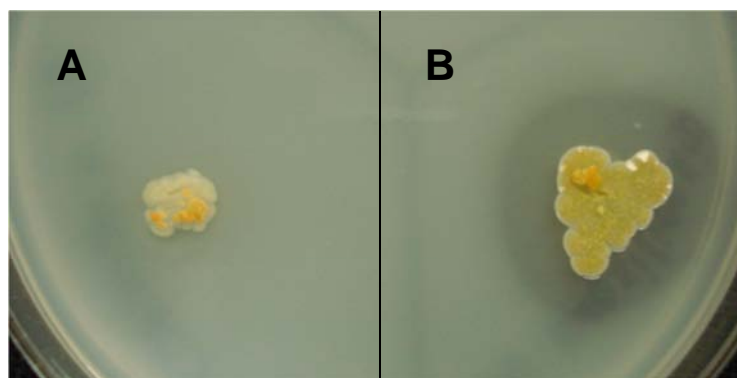


Figura 5. Prueba de hidrolisis de caseína. A: prueba negativa, B: prueba positiva.

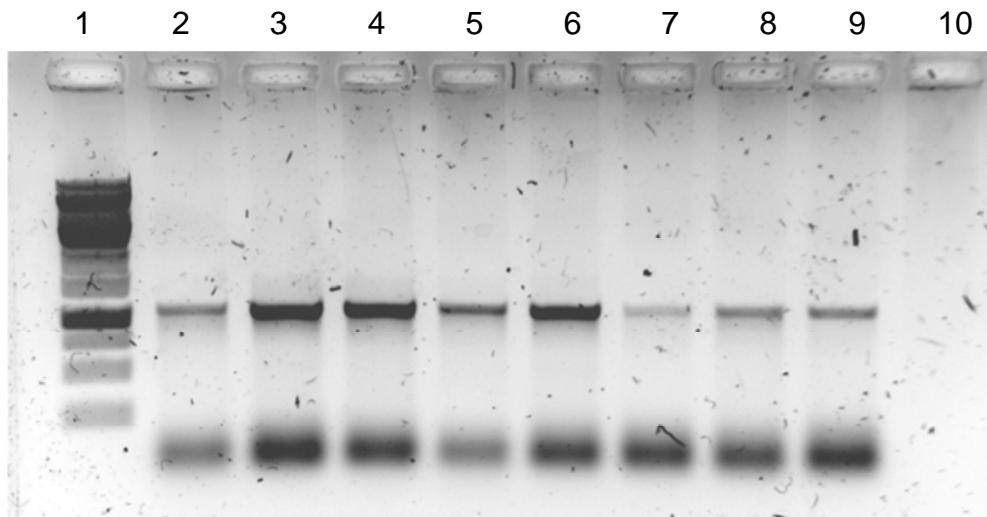


Figura 6. Productos de amplificación (1109 pb) de la subunidad 16S rRNA en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular de 1Kb, carriles 2-9: cepas en estudio 024-09, 860-10, 860-11, 1827-12, 040-13, 1183-12, C-01 y C-03, carril 10: control negativo.

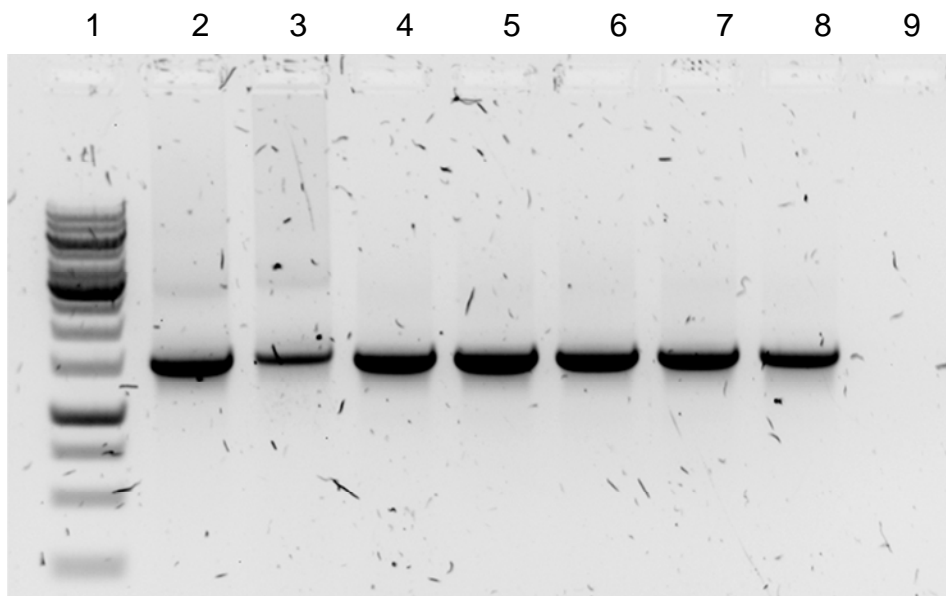


Figura 7. Productos de amplificación (1200 pb) de la subunidad 16S rRNA en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador de peso molecular de 1Kb, carriles 2-8: cepas en estudio 1036-13, 790-13, 1077-13, 1465-13, 1531-13, 257-10 y C-02, carril 9: control negativo.

Las secuencias de 24 cepas mostraron homología con *N. brasiliensis*, 6 de ellas con el 100% de identidad y 18 con el 99%, las cepas C-01 y C-03 presentaron homología con *N. farcinica* y *N. mexicana*, respectivamente, ambas con el 99% de identidad (Tabla 4).

Tabla 4. Relación entre la identificación fenotípica y la identificación molecular.

No./ID	Fenotipo	Molecular	Pb	Homología
712-06	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1099	100%
024-09	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1014	99%
1311-09	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1134	100%
218-10	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1109	100%
860-10	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1056	99%
2074-10	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1114	99%
822-11	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	984	99%
860-11	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1042	99%
1425-11	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	931	99%
695-12	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	988	99%
1827-12	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1027	99%
040-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1042	99%
153-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1039	99%
1036-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	637	99%
790-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	999	100%
1077-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1135	100%
1465-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	621	99%
1531-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	976	99%
257-10	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	990	99%
685-10	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	889	100%
1183-12	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	834	99%
407-13	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	988	99%
C-01	<i>N. asteroides</i>	<i>N. farcinica</i>	1043	99%
C-02	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1097	99%
C-03	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. mexicana</i>	1057	99%
134-14	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	1096	99%

Fueron alineadas las 24 secuencias de las cepas identificadas como *N. brasiliensis* con la secuencia de *N. brasiliensis* ATCC 700358, la secuencia de la cepa C-01 fue alineada con 6 secuencias de *N. farcinica* descargadas del GenBank y la secuencia de la cepa C-03 con 4 secuencias de *N. mexicana*, también obtenidas del GenBank. Algunas de las secuencias alineadas presentaron cambios en nucleótidos, éstos y su posición dentro de las alineaciones se detallan en las tablas 5, 7 y 9.

Tabla 5. Diferencias de nucleótidos entre las secuencias de *N. brasiliensis*.

Secuencia	Posición	Cambio de Nucleotido <sup>a</sup>	Secuencia	Posición	Cambio de Nucleotido <sup>a</sup>
024-09	198	T/G	1531-13	897	A/T
	376	A/G		952	G/A
860-10	58	T/A		965	T/G
	59	G/T		970	G/T
822-11	891	C/A	257-10	965	T/G
	894	A/G		1000	A/G
	919	C/G		1002	G/C
	960	A/T		1015	C/G
	961	C/A	1183-12	805	T/G
	968	G/T		823	A/G
983	C/A	825		C/G	
1425-11	871	C/G		838	T/G
	891	C/A		844	T/G
	914	C/A		845	T/C
	938	A/T	869	G/A	
	965	C/G	407-13	933	A/T
	968	G/T		935	T/A
	981	C/G		952	G/A
695-12	945	G/A		1023	A/G
	957	A/C	C-02	451	T/C
	987	A/C		705	A/G
	1007	C/T	1036-13	547	C/A
	1023	A/G		619	A/G
040-13	983	G/A		639	T/G
153-13	956	A/--- <sup>b</sup>		665	T/G
	1023	C/G		678	A/G
				685	C/G

<sup>a</sup>Nucleótido diferente / Nucleótido conservado en otras secuencias.

<sup>b</sup>Nucleótido ausente en las otras secuencias.



Tabla 6. Tabla de identidad de secuencias de *N. brasiliensis* obtenida a partir de la alineación con ClustalW. Muestra la homología entre las cepas identificadas como *N. brasiliensis*.

Secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N. brasiliensis ATCC 700358	99	100	100	100	100	99	99	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
695-12 (1)		100	99	99	100	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
685-10 (2)			100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
407-13 (3)				100	100	99	99	99	99	99	99	100	100	99	100	100	99	100	99	100	100	99	100	100
153-13 (4)					100	99	99	99	99	99	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1465-13 (5)						100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1425-11 (6)							99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
1183-12 (7)								99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
1036-13 (8)									99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
822-11 (9)										99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
257-10 (10)											99	100	100	99	100	100	99	100	99	100	100	99	100	100
1531-13 (11)												100	100	99	100	100	99	100	99	100	100	99	100	100
1827-12 (12)													100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
218-10 (13)														100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
040-13 (14)															100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
134-14 (15)																100	100	100	100	100	100	100	100	100
860-11 (16)																	100	100	100	100	100	100	100	100
024-09 (17)																		100	100	100	100	100	100	100
790-13 (18)																			100	100	100	100	100	100
860-10 (19)																				100	100	100	100	100
712-06 (20)																					100	100	100	100
1311-09 (21)																						100	100	100
C-02 (22)																							100	100
2074-10 (23)																								100
1077-13 (24)																								

Tabla 7. Diferencias de nucleótidos entre las secuencias de *N. farcinica*.

Secuencia	Posición	Cambio de Nucleótido <sup>a</sup>
C-01	993	T/G
	994	G/T
Noc12	395	G/A
	396	C/A
	397	T/A
	412	T/G
	413	G/A

<sup>a</sup> Nucleótido diferente / Nucleótido conservado en otras secuencias.

Tabla 8. Tabla de identidad de secuencias de *N. farcinica* obtenida a partir de la alineación con ClustalW.

Secuencia	C-01	<i>N. farcinica</i> 7400458	<i>N. farcinica</i> IFM 11285	<i>N. farcinica</i> ATCC 3318	<i>N. farcinica</i> Noc12	<i>N. farcinica</i> SD1819
<i>N. farcinica</i> PCM 2712	100	100	100	100	99	100
C-01		100	100	100	99	100
<i>N. farcinica</i> 7400458			100	100	99	100
<i>N. farcinica</i> IFM 11285				100	99	100
<i>N. farcinica</i> ATCC 3318					99	100
<i>N. farcinica</i> Noc12						99
<i>N. farcinica</i> SD1819						

Tabla 9. Diferencias de nucleótidos entre las secuencias de *N. mexicana*.

Secuencia	Posición	Cambio de Nucleótido <sup>a</sup>
C-03	1036	C/T
	1039	T/G
DMS 44952	128	K/T
S/N	128	K/T
PCH16S-019	153	A/G
	154	T/C
	155	G/T
	164	T/G
	409	T/A
	410	C/G
	411	C/G
	419	G/C
	433	G/C
	434	G/C
435	A/T	

<sup>a</sup> Nucleótido diferente / Nucleótido conservado en otras secuencias.

Tabla 10. Tabla de identidad de secuencias de *N. mexicana* obtenida a partir de la alineación con ClustalW.

Secuencia	C-03	<i>N. mexicana</i> PCH16S-019	<i>N. mexicana</i> DSM 44952	<i>N. mexicana</i> S/N
<i>N. mexicana</i> OFN 704	100	99	100	100
C-03		99	100	100
<i>N. mexicana</i> PCH16S-019			99	99
<i>N. mexicana</i> DSM 44952				100
<i>N. mexicana</i> S/N				

Se creó un árbol filogenético, alineando las 26 secuencias de las cepas estudiadas y 34 secuencias de especies representativas de *Nocardia* spp., descargadas del GenBank, visualizándose de manera gráfica como cladograma rectangular y como filograma (Figuras 8 y 9).

En el árbol filogenético es posible observar 5 clados bien definidos, en el primero se encuentra la cepa de *N. brasiliensis* ATCC 700358 junto con 22 de las 24 secuencias de las cepas en estudio identificadas como *N. brasiliensis*, en el segundo clado se pueden observar las secuencias C-02 y 024-09 también identificadas como *N. brasiliensis*, mientras que el tercer clado pertenece a la secuencia de *N. iowensis* NRRL 5646. El cuarto clado está formado por la mayor variedad de especies de *Nocardia*, entre las que se encuentra la secuencia de la cepa en estudio C-03 junto con *N. mexicana* OFN 704 y C-01 junto a *N. farcinica* PCM 2712. Finalmente, en el quinto clado se encuentran las secuencias de *N. altamirensis* DMS 44997, *N. cyriacigeorgica* GR-22D y *N. tenerifensis* NEA30.

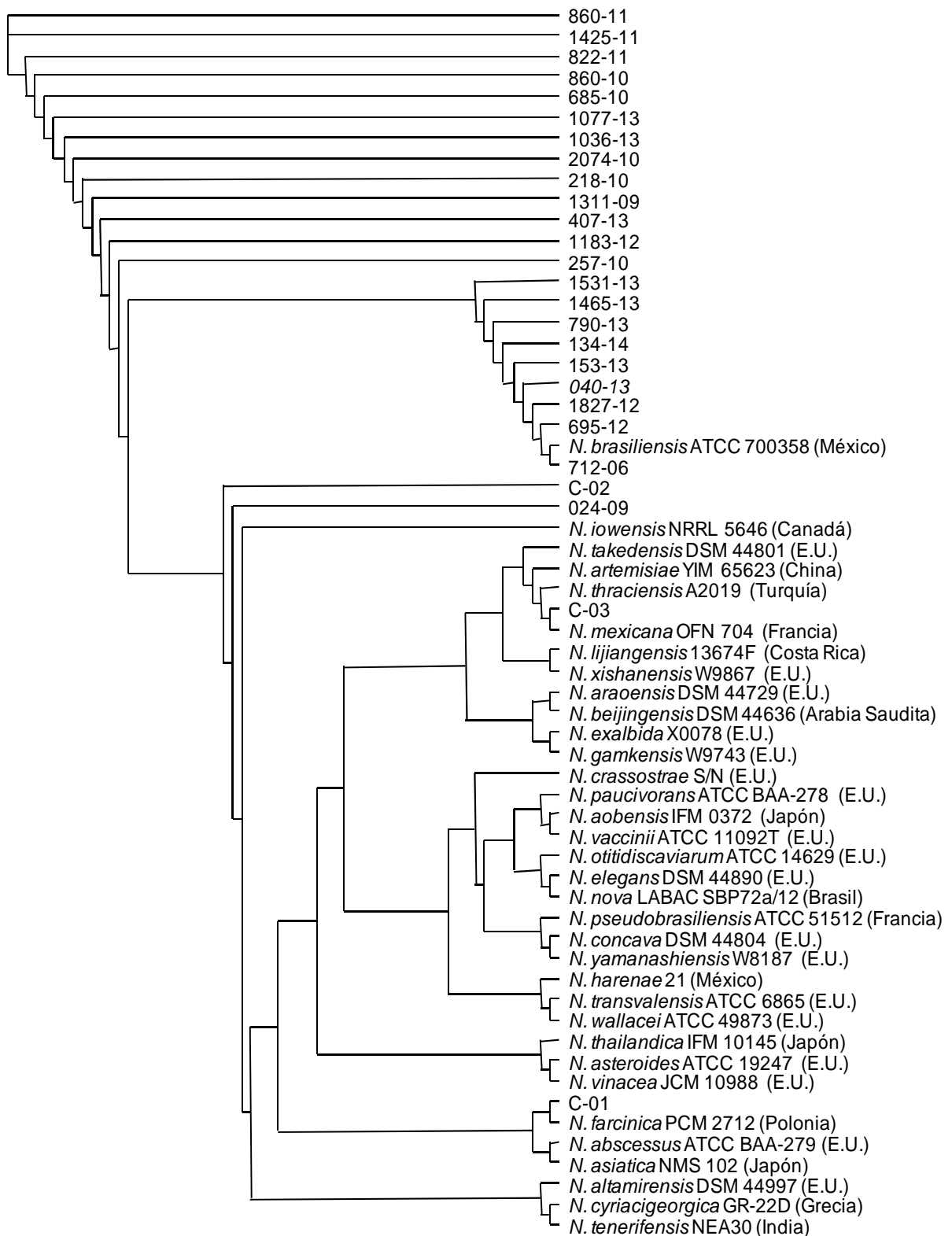


Figura 8. Árbol filogenético (cladograma rectangular) basado en secuencias del gen 16S rRNA de especies del género *Nocardia*, utilizando el método del vecino más cercano “Neighbour Joining”. El país de origen de las secuencias se muestra entre paréntesis.

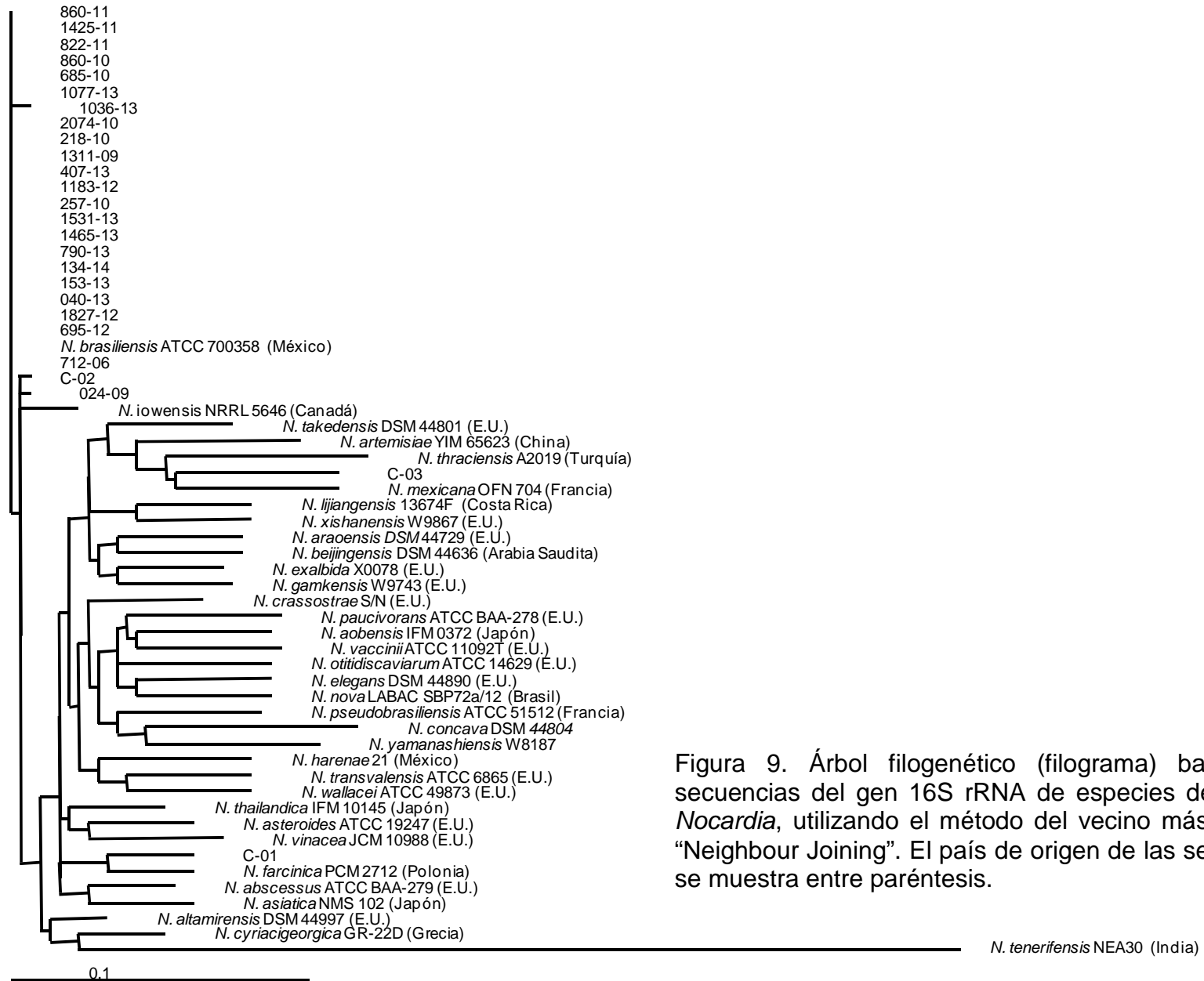


Figura 9. Árbol filogenético (filograma) basado en secuencias del gen 16S rRNA de especies del género *Nocardia*, utilizando el método del vecino más cercano "Neighbour Joining". El país de origen de las secuencias se muestra entre paréntesis.

## **DISCUSIÓN**

En 2013 López-Martínez y cols. en México y van de Sande a nivel internacional, realizaron trabajos que muestran la epidemiología del micetoma [2,10]. Los datos clínicos de los pacientes con micetoma (Tabla 2, Figura 2), muestran similitud con los resultados epidemiológicos obtenidos en los trabajos antes mencionados, el 60% de los casos fueron de campesinos y el mayor número de casos se presentó entre los 16 y los 45 años de edad, ambos datos muy cercanos a lo reportado. Respecto a la procedencia, Morelos fue el estado con mayor número de casos, el segundo con la mayor casuística en México según el estudio de López-Martínez y cols. [10]. La proporción de afectación de hombres respecto a mujeres resultó de 5:1, y por otro lado, el porcentaje de casos por *N. brasiliensis* fue del 92%, ambos datos son mayores a lo reportado, sin embargo, es necesario tomar en cuenta que se trabajó con una n=25, lo que influye en los porcentajes obtenidos.

Con las pruebas bioquímicas y la macromorfología, se identificaron 24 cepas como *N. brasiliensis*, la cepa C-01 como *N. asteroides* y la C-03 como *N. otitidiscaviarum* (antes *N. cavie*). De las cepas identificadas como *N. brasiliensis*, la 790-13 y 1077-13 inicialmente presentaron un perfil bioquímico atípico ya que se observó una reacción débil de hidrólisis de caseína y licuefacción de gelatina después de 30 días de incubación.

La secuenciación del gen 16S rRNA y los métodos fenotípicos concordaron en la identificación de la especie del 92% de las cepas en estudio, ya que fueron identificadas 24 cepas como *N. brasiliensis* con una homología del 99% y 100%. Por otro lado, se observaron discrepancias (8%) respecto a la cepa C-01 y C-03 ya que las secuencias mostraron una homología del 99% con *N. farcinica* y *N. mexicana*, respectivamente, las cuales son prácticamente imposibles de identificar con métodos fenotípicos debido a la similitud bioquímica y morfológica con otras especies. El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA es el método más frecuentemente utilizado para la identificación definitiva de especies del género

*Nocardia* debido a la rapidez de la técnica, la alta especificidad y la poca probabilidad de error [8,17], una identificación correcta de la especie no sólo es necesaria para una apropiada selección del antibiótico y la duración del tratamiento, también contribuye para el mejor entendimiento de la epidemiología y la patogenicidad de la bacteria [8]. Por otro lado, el gen 16S rRNA es actualmente el único marcador taxonómico más ampliamente utilizado, lo suficientemente informativo y que ha sido compilado en grandes bases de datos, esto ha llevado a entender las relaciones filogenéticas entre las especies de *Nocardia* [17].

El análisis filogenético es en la actualidad una herramienta útil en estudios clínicos, cuyo objetivo es ilustrar y determinar el impacto de la diversidad de los microorganismos estudiados a partir de cómo se relacionan genéticamente [24], con esta finalidad se construyó un árbol filogenético (Figuras 8 y 9) en el que se incluyeron secuencias de especies representativas del género *Nocardia* para observar cómo se ubican las secuencias de las 26 cepas en estudio.

El árbol filogenético consta de 5 clados, en el primero se encuentran casi todas las cepas identificadas como *N. brasiliensis*. Las cepas C-02 y 024-09 presentan un cambio importante de nucleótidos en la posición 198 y 451 (Apéndice B), que se ubican dentro de las zonas hipervariables V2 (nucleótidos 137-242) y V3 (nucleótidos 433-497), respectivamente, razón por la cual se encuentran separadas en un segundo clado. La secuencia *N. iowensis* NRRL 5646 ocupa el tercer clado mientras que en el cuarto se ubican una gran variedad de especies, incluida la secuencia C-03 junto a *N. mexicana* OFN 704 y la secuencia C-01 junto a *N. farcinica* PCM 2712, demostrándose la gran similitud entre estas secuencias. El quinto clado lo conforman 3 especies, *N. altamirensis*, *N. cyriacigeorgica* y *N. tenerifensis*, esta última muy distante a las otras debido a las diferencias de nucleótidos en su secuencia.

La identificación basada en la secuenciación de la subunidad 16S rRNA es útil para microorganismos cultivables de lento crecimiento y no cultivables y en el caso

de bacterias difíciles de identificar por métodos convencionales. Sin embargo, esta técnica cuenta con algunas limitaciones, el costo sigue siendo alto para aplicarla como método de rutina en el laboratorio clínico, además es necesario considerar que la extracción, amplificación, purificación y secuenciación de DNA deben ser realizadas manualmente y los resultados interpretados por investigadores con conocimientos y experiencia tanto en la técnica como en sus fundamentos [8,19].

Además, la exitosa identificación de un microorganismo mediante secuenciación, requiere de una base de datos completa y confiable. Esto cobra importancia al interpretar los resultados de una secuenciación, debido a que se propuesto para la identificación de especie un porcentaje de identidad mayor al 99% [8], para lo cual en la mayoría de las ocasiones es necesario analizar a detalle la secuencia "cruda". Esto aún representa un reto, ya que las bases de datos públicas contienen gran cantidad de errores, secuencias de mala calidad y pocas o nulas secuencias de algunas especies de microorganismos [25]. Un estudio realizado en 2005 estimó que aproximadamente 5% de 1,399 secuencias encontradas en bases de datos, contienen errores considerables [26].

En resumen, los métodos convencionales como lo son las pruebas bioquímicas, todavía no pueden ser remplazados por completo por la secuenciación de la subunidad 16S rRNA como método diagnóstico en el laboratorio clínico, ya que para incrementar la precisión en la identificación de la bacteria de interés, es necesario contar con pruebas fenotípicas previas.



## **CONCLUSIONES**

Se identificó la especie de las 26 cepas de *Nocardia* provenientes de muestras clínicas, obteniéndose 24 cepas que fueron identificadas tanto por los métodos fenotípicos como por la técnica molecular como *N. brasiliensis*. Las dos cepas restantes fueron identificadas como *N. mexicana* y *N. farcinica* únicamente a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA ya que son especies dentro del complejo *N. asteroides*.

La secuenciación del gen 16S rRNA es una técnica muy útil que cuenta con grandes ventajas, permitiendo identificar la especie de cepas de *Nocardia* con un perfil bioquímico atípico. Sin embargo, debido a que posee varias limitaciones, no es posible sustituir por completo los estudios fenotípicos, además es necesario generar ciertas directrices para su interpretación e implementación en el laboratorio clínico como un método diagnóstico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Calderón L, Saúl A, Araiza J, Hernández M, González GM, Ponce RM. Mycetoma: experience of 482 cases in a single center in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 21;8(8):e3102.
2. van de Sande WW. Global burden of human mycetoma: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7;7(11):e2550.
3. van de Sande WW, Maghoub el S, Fahal AH, Goodfellow M, Welsh O, Zijlstra E. The mycetoma knowledge gap: identification of research priorities. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(3):e2667.
4. Goodfellow M. Actinobacteria: Family IV. *Nocardiaceae*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>a</sup> ed. Vol. 5. Springer-Verlag. EUA. 2009. 376-419 p.
5. Brown-Elliot BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev. 2006; 19:259-82.
6. Gordon RE, Mimh JM. The type species of the genus *Nocardia*. J Gen Microbiol. 1962; 27:1-10.
7. 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;14(10):908-34.
8. Das S, Dash HR, Mangwani N, Chakraborty J, Kumari S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. J Microbiol Methods. 2014; 103:80-100.
9. Bonifaz A. Propiedades generales de los actinomicetos. *En* Micología Médica Básica. 4<sup>a</sup> ed. Cap 3. McGraw-Gill. México. 2012.
10. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, Vera-Cabrera L, Padilla-Desgarenes MC, Contreras Pérez C, Chávez G, Estrada R, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P. Actualización de la epidemiología del micetoma en México: Revisión de 3,933 casos. Gac Med Mex. 2013; 149(5):586-92.
11. Hernandez-Hernandez F, Lopez-Martinez R, Mendez-Tovar LJ, Manzano-Gayosso P. *Nocardia brasiliensis*: *in vitro* and *in vivo* growth response to steroid sex hormones. Mycopathologia. 1995; 132(2):79-85.

12. Bonifaz A. Micosis subcutáneas: Micetoma. *En: Micología Médica Básica*. 4ª ed. Cap 14. McGraw-Hill, México. 2012
13. Bonifaz A. Propiedades Nocardiosis. *En: Micología Médica Básica*. 4ª ed. Cap 35. McGraw-Gill. México. 2012.
14. Corti ME, Villafañe-Fioti MF. Nocardiosis: a review. *Int J Infect Dis*. 2003; 7(4):243-50. Review.
15. McFaddin JF. Pruebas de licuefacción de gelatina. *En: Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3ª ed. Cap. 12. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2003.
16. Koneman EW. Protocolos: Protocolo 38. Hidrólisis de xantina, hipoxantina, tirosina y caseína. *En Diagnóstico Microbiológico*. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1999.
17. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(9):635-45.
18. Clarridge JE III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):840-62, table of contents. Review.
19. Cai H, Archambault M, Prescott JF. 16S ribosomal RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J Vet Diagn Invest*. 2003;15(5):465-9.
20. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):330-9.
21. Almeida LA, Araujo R. Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol*. 2013;13:67-75. Review.
22. Altschul SF. BLAST algorithm. *In: Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. 2005.
23. Kong F, Chen SC, Chen X, Sintchenko V, Halliday C, Cai L, Tong Z, Lee OC, Sorrell TC. Assignment of reference 5'-end 16S rDNA sequences and species-specific sequence polymorphisms improves species identification of *Nocardia*. *Open Microbiol J*. 2009; 3:97-105.

24. Hartfield M, Murall CL, Alizon S. Clinical applications of pathogen phylogenies. *Trends Mol Med*. 2014;20(7):394-404. Review
25. Conville PS, Murray PR, Zelazny AM. Evaluation of the integrated database network system (IDNS) SmartGene software for analysis of 16S rRNA gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(8):2995-8.
26. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2761-4. Review.

## **APÉNDICE A. PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

### **Hidrólisis de xantina e hipoxantina, tirosina y caseína**

#### **I. Principio**

Los actinomicetos aerobios pueden caracterizarse por su capacidad de hidrolizar xantina, hipoxantina, tirosina y caseína. Estos compuestos se incorporan al agar nutritivo, sobre cuya superficie se siembran altas cantidades de microorganismos.

#### **II. Medios y reactivos**

##### **A. Suspensiones de xantina, hipoxantina y tirosina**

Medio basal	
Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 L

Suspensiones	
Tirosina	0.5 g
Xantina	0.4 g
Hipoxantina	0.4 g
Agua destilada	100 mL

Calentar el medio basal para disolver los ingredientes y fraccionar en alícuotas de 100 mL. Esterilizar en autoclave (121°C, 15 psi, 15 min). Dejar enfriar el medio hasta que esté casi solidificado. Agregar 10 mL de suspensiones de xantina, hipoxantina o tirosina (previamente esterilizadas). Es esencial que los gránulos de xantina, hipoxantina y tirosina se mantengan en suspensión hasta que el medio se solidifique. Los medios se vierten en cajas de Petri estériles.

##### **B. Medio de caseína**

Solución A	
Leche descremada (polvo)	10.0 g
Agua destilada	100 mL

Solución B	
Agar	2.0 g
Agua destilada	100 mL

Colocar las soluciones A y B en autoclave por separado, dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C, mezclar A y B y verter en placas de Petri estériles.

III. Procedimiento

Cada placa de xantina, hipoxantina, tirosina y caseína se siembra colocando un inóculo abundante del microorganismo a identificar. Las placas se incuban a 28°C y se leen a los siguientes tiempos:

Hidrólisis de caseína	Leer después de 2 semanas
Hidrólisis de xantina, hipoxantina y tirosina	Leer después de 3 semanas

IV. Resultados

Interpretación. La hidrólisis de caseína se evidencia por un aclaramiento completo hasta la transparencia del medio originalmente blanco y lechoso. Las otras tres hidrólisis se leen observando la disolución de los compuestos cristalinos alrededor de las colonias que se desarrollan en el medio.

V. Referencias

Modificado de Koneman EW, 1999.

## Licuefacción de gelatina

### I. Principio

La producción de enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) es útil en la identificación de bacterias como los actinomicetos. La gelatina es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes.

### II. Medios y reactivos

#### A. Medio de gelatina nutriente para punción

Extracto de carne, extracto de ternera o caldo infusión	3 g
Peptona	5 g
Gelatina al 12%	120 g
Agua desionizada	1 000 mL

Medio comercial deshidratado. Pesar con precisión la cantidad indicada en la etiqueta y rehidratar con agua desionizada. Calentar suavemente hasta disolver y distribuir aproximadamente 4-5 mL por tubo y esterilizar en autoclave (121°C, 15 psi, 15 min). Dejar que el medio solidifique en posición vertical y refrigerar para almacenamiento (4-10°C).

### III. Procedimiento

Inocular abundantemente por picadura el microorganismo a identificar hasta una profundidad de 1.25 a 2.50 cm. Preparar un tubo control (no inoculado). Incubar de 22-25°C o 35°C de 24 h-14 días:

1. Observar si hay desarrollo (turbidez) y licuefacción.  
Cada 24 h colocar ambos tubos en un refrigerado o baño de hielo aproximadamente 2 h para determinar si ha habido licuefacción de la gelatina.
2. Controlar los tubos diariamente hasta las 2 semanas, a menos que la licuefacción ocurra antes.

### IV. Resultados

1. Licuefacción. Microorganismo a identificar: medio licuado. La licuefacción de la gelatina comienza en la superficie del medio y se extiende.
2. Sin licuefacción. Microorganismo a identificar: el medio permanece sólido (reincubar un tiempo adicional).
3. Tubo control: el medio permanece sólido; forma un gel firme debido a la resolidificación de la gelatina no licuada.

### V. Referencias

Modificado de McFaddin JF, 2003.

## APÉNDICE B. ALINEACIONES

Código de color	Nucleótido
TAA	Conservativo
GCA	Idéntico
GGT	Diferente

		51		100
N. brasiliensis ATCC 700358	(51)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
695-12	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
685-10	(7)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
407-13	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
153-13	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1465-13	(3)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1425-11	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1183-12	(10)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1036-13	(1)		-----ACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
822-11	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
257-10	(1)		-----CATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1531-13	(1)		-----CATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1827-12	(5)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
218-10	(10)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
040-13	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
134-14	(7)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
860-11	(12)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
024-09	(8)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
790-13	(1)		-----TGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
860-10	(8)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
712-06	(10)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1311-09	(1)		---ACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
C-02	(7)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
2074-10	(3)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	
1077-13	(9)		TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCG	

		151		200
N. brasiliensis ATCC 700358	(151)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
695-12	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
685-10	(107)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
407-13	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
153-13	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1465-13	(103)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1425-11	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1183-12	(110)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1036-13	(96)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
822-11	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
257-10	(95)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1531-13	(95)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1827-12	(105)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
218-10	(110)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
040-13	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
134-14	(107)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
860-11	(112)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
024-09	(108)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
790-13	(93)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
860-10	(108)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
712-06	(110)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1311-09	(98)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
C-02	(107)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
2074-10	(103)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	
1077-13	(109)		GGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTTCAGTGCATGCTGTTGGG	



		351	400
N. brasiliensis ATCC 700358	(351)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
695-12	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
685-10	(307)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
407-13	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
153-13	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1465-13	(303)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1425-11	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1183-12	(310)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1036-13	(296)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
822-11	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
257-10	(295)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1531-13	(295)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1827-12	(305)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
218-10	(310)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
040-13	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
134-14	(307)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
860-11	(312)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
024-09	(308)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
790-13	(293)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
860-10	(308)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
712-06	(310)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1311-09	(298)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
C-02	(307)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
2074-10	(303)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
1077-13	(309)	AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG	AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT

		451	500
N. brasiliensis ATCC 700358	(451)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
695-12	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
685-10	(407)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
407-13	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
153-13	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1465-13	(403)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1425-11	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1183-12	(410)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1036-13	(396)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
822-11	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
257-10	(395)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1531-13	(395)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1827-12	(405)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
218-10	(410)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
040-13	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
134-14	(407)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
860-11	(412)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
024-09	(408)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
790-13	(393)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
860-10	(408)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
712-06	(410)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1311-09	(398)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
C-02	(407)	TAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
2074-10	(403)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	
1077-13	(409)	CAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGC	

		501	550
N. brasiliensis ATCC 700358	(501)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
695-12	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
685-10	(457)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
407-13	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
153-13	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1465-13	(453)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1425-11	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1183-12	(460)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1036-13	(446)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
822-11	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
257-10	(445)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1531-13	(445)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1827-12	(455)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
218-10	(460)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
040-13	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
134-14	(457)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
860-11	(462)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
024-09	(458)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
790-13	(443)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
860-10	(458)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
712-06	(460)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1311-09	(448)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
C-02	(457)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
2074-10	(453)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	
1077-13	(459)	CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAG	

		601	650
N. brasiliensis ATCC 700358	(601)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
695-12	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
685-10	(557)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
407-13	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
153-13	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1465-13	(553)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1425-11	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1183-12	(560)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1036-13	(546)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
822-11	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
257-10	(545)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1531-13	(545)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1827-12	(555)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
218-10	(560)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
040-13	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
134-14	(557)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
860-11	(562)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
024-09	(558)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
790-13	(543)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
860-10	(558)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
712-06	(560)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1311-09	(548)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
C-02	(557)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
2074-10	(553)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	
1077-13	(559)	CAAGCTTGC GG GCGATACGGGCAGACTTGAGTACTTCA GGGGAGACTGGA	

		651	700
N. brasiliensis ATCC 700358	(651)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
695-12	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
685-10	(607)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
407-13	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
153-13	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1465-13	(603)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	-----
1425-11	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1183-12	(610)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1036-13	(596)	ATTCTGGTGTAGCTGTGA	AATGCGCAATATCACGAGGAAC-----
822-11	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
257-10	(595)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1531-13	(595)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1827-12	(605)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
218-10	(610)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
040-13	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
134-14	(607)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
860-11	(612)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
024-09	(608)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
790-13	(593)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
860-10	(608)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
712-06	(610)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1311-09	(598)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
C-02	(607)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
2074-10	(603)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
1077-13	(609)	ATTCTGGTGTAGCGGTGA	AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG

		701	750
N. brasiliensis ATCC 700358	(701)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
695-12	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
685-10	(657)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
407-13	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
153-13	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1465-13	(622)	-----	-----
1425-11	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1183-12	(660)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1036-13	(638)	-----	-----
822-11	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
257-10	(645)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1531-13	(645)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1827-12	(655)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
218-10	(660)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
040-13	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
134-14	(657)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
860-10	(662)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
024-09	(658)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
790-13	(643)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
860-10	(658)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
712-06	(660)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1311-09	(648)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
C-02	(657)	CGAAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
2074-10	(653)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG
1077-13	(659)	CGAAGCGGGTCTCTGGGAAGTA	ACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGG

		801	850
N. brasiliensis ATCC 700358	(801)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
695-12	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
685-10	(757)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
407-13	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
153-13	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
1465-13	(622)	-----	
1425-11	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
1183-12	(760)	CTAGTTGTGGGTTTCCTTCCACAGCATCCGTGCCGTATCTAACTTATTAA	
1036-13	(638)	-----	
822-11	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
257-10	(745)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
1531-13	(745)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
1827-12	(755)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
218-10	(760)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
040-13	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
134-14	(757)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
860-10	(762)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
024-09	(758)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
790-13	(743)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
860-10	(758)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
712-06	(760)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
1311-09	(748)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
C-02	(757)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
2074-10	(753)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	
1077-13	(759)	CTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAA	

		851	900
N. brasiliensis ATCC 700358	(851)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
695-12	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
685-10	(807)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
407-13	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
153-13	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
1465-13	(622)	-----	
1425-10	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGCCGCAAGGCTAAAACCTCAGAGGAATTGA	
1183-12	(810)	GTACCCCGCCTGGGGAGTCCGGCCG-----	
1036-13	(638)	-----	
822-11	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAGAAATTGA	
257-10	(795)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
1531-13	(795)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAAATTGA	
1827-12	(805)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
218-10	(810)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
040-13	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
134-14	(807)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
860-11	(812)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
024-09	(808)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
790-13	(793)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
860-10	(808)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
712-06	(810)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
1311-09	(798)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
C-02	(807)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
2074-10	(803)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	
1077-13	(809)	GTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	

		901	950
N. brasiliensis ATCC 700358	(901)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
695-12	(843)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCGACGCG	
685-10	(857)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGAT-----	
407-13	(843)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTATTCGATGCAACGCG	
153-13	(843)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
1465-13	(622)	-----	
1425-10	(843)	CGGGGGCCCGCACAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATAACGATGCAACGCG	
1183-12	(835)	-----	
1036-13	(638)	-----	
822-11	(843)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGCCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
257-10	(845)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
1531-13	(845)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
1827-12	(855)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
218-10	(860)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
040-13	(843)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
134-14	(857)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
860-11	(862)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
024-09	(858)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
790-13	(843)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
860-10	(858)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
712-06	(860)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
1311-09	(848)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
C-02	(857)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
2074-10	(853)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	
1077-13	(859)	CGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGATGCAACGCG	

		951	1000
N. brasiliensis ATCC 700358	(951)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
695-12	(893)	AAGAA-ACTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACAATGCAGAGATGTAG	
685-10	(890)	-----	
407-13	(893)	AGGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
153-13	(893)	AAGAAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
1465-13	(622)	-----	
1425-11	(893)	AAGAA-CCTTACCTCGGGTTGACATACACCAGAAACCTGC-----	
1183-12	(835)	-----	
1036-13	(638)	-----	
822-11	(893)	AAGAA-CCTACCCTGGGTTTGACATACACCGCAACCTGCAGAGATGTAG	
257-10	(895)	AAGAA-CCTTACCTTGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAA	
1531-13	(895)	AGGAA-CCTTACCTTGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
1827-12	(905)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
218-10	(910)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
040-13	(893)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
134-14	(907)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
860-10	(912)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
024-09	(908)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
790-13	(893)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
860-10	(908)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
712-06	(910)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
1311-09	(898)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
C-02	(907)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
2074-10	(903)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	
1077-13	(909)	AAGAA-CCTTACCTGGGTTTGACATACACCGGAAACCTGCAGAGATGTAG	

		1001	1050
N. brasiliensis ATCC 700358	(1000)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
695-12	(942)	GCCCCCCTGTGGTCGGTGTACAAGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC---	
685-10	(890)	-----	
407-13	(942)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAAGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC---	
153-13	(943)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAAGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
1465-13	(622)	-----	
1425-11	(932)	-----	
1183-12	(835)	-----	
1036-13	(638)	-----	
822-11	(942)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCA-----	
257-10	(944)	GCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTC---	
1531-13	(944)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATG-----	
1827-12	(954)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
218-10	(959)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
040-13	(942)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
134-14	(956)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
860-11	(961)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
024-09	(957)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
790-13	(942)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
860-10	(957)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
712-06	(959)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
1311-09	(947)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
C-02	(956)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
2074-10	(952)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	
1077-13	(958)	GCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG	

		1051	1100
N. brasiliensis ATCC 700358	(1050)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
695-12	(989)	-----	
685-10	(890)	-----	
407-13	(989)	-----	
153-13	(993)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCCTTGTCCCT---	
1465-13	(622)	-----	
1425-11	(932)	-----	
1183-12	(835)	-----	
1036-13	(638)	-----	
822-11	(985)	-----	
257-10	(991)	-----	
1531-13	(977)	-----	
1827-12	(1004)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC-----	
218-10	(1009)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
040-13	(992)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
134-14	(1006)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
860-11	(1011)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG-----	
024-09	(1007)	TCGTGAGA-----	
790-13	(992)	TCGTGAGA-----	
860-10	(1007)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
712-06	(1009)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
1311-09	(997)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
C-02	(1006)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
2074-10	(1002)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	
1077-13	(1008)	TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGTG	

		1101	1150
N. brasiliensis ATCC 700358	(1100)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	GGTCAACTC
695-12	(989)	-----	-----
685-10	(890)	-----	-----
407-13	(989)	-----	-----
153-13	(1040)	-----	-----
1465-13	(622)	-----	-----
1425-11	(932)	-----	-----
1183-12	(835)	-----	-----
1036-13	(638)	-----	-----
822-11	(985)	-----	-----
257-10	(991)	-----	-----
1531-13	(977)	-----	-----
1827-12	(1028)	-----	-----
218-10	(1059)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	GGTCAACTC
040-13	(1042)	T-----	-----
134-14	(1056)	TTGCCAGCGCGTAATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	-----
860-11	(1043)	-----	-----
024-09	(1015)	-----	-----
790-13	(1000)	-----	-----
860-10	(1057)	-----	-----
712-06	(1059)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	-----
1311-09	(1047)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	GGTCAACTC
C-02	(1056)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	G-----
2074-10	(1052)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	GGTCAACTC
1077-13	(1058)	TTGCCAGCGGATTATGCCGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGG	GGTCAACTC

Alineación 1. Secuencias de las cepas *N. brasiliensis* ATCC 700358 (referencia), 712-06, 024-14, 1311-09, 218-10, 860-10, 2074-09, 822-11, 860-11, 1425-11, 695-12, 1827-12, 040-13, 153-13, 1036-13, 790-13, 1077-13, 1465-13, 1531-13, 257-10, 685-10, 1183-12, 407-13, 407-13 y C-02 en el programa ClustalW.

		351	400
N. farcinica PCM 2712	(351)	CTGATGCAGCGACGCCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	CCT
C-01	(335)	CTGATGCAGCGACGCCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	CCT
N. farcinica 7400458	(351)	CTGATGCAGCGACGCCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	CCT
N. farcinica IFM 11285	(351)	CTGATGCAGCGACGCCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	CCT
N. farcinica ATCC 3318	(302)	CTGATGCAGCGACGCCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	CCT
N. farcinica Noc12	(1)	-----	GCTCCT
N. farcinica SD1819	(327)	CTGATGCAGCGACGCCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAA	CCT

		401	450
N. farcinica PCM 2712	(401)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	
C-01	(385)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	
N. farcinica 7400458	(401)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	
N. farcinica IFM 11285	(401)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	
N. farcinica ATCC 3318	(352)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	
N. farcinica Noc12	(7)	CTTTCGACAGGTGCCAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	
N. farcinica SD1819	(377)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG	

		951	1000
N. farcinica PCM 2712	(951)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	
C-01	(935)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	
N. farcinica 7400458	(951)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	
N. farcinica IFM 11285	(951)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	
N. farcinica ATCC 3318	(902)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	
N. farcinica Noc12	(557)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	
N. farcinica SD1819	(927)	GAAACCTGCAGAGATGTAGGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGTGGTGCA	

Alineación 2. Secuencias de las cepas *N. farcinica* PCM 2712 (referencia), *N. farcinica* 7400458, *N. farcinica* IFM 11285, *N. farcinica* ATCC 3318, *N. farcinica* Noc12, *N. farcinica* SD1819 y C-01 en el programa ClustalW.

		101		150
N. mexicana OFN 704	(83)	TCGTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC	TGGGTCTAATACCGGATATGACC	
C-03	(83)	TCGTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC	TGGGTCTAATACCGGATATGACC	
N. mexicana PCH16S-019	(91)	TCGTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC	TGGGTCTAATACCGGATATGACC	
N. mexicana DSM 44952	(76)	TCGTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC	KGGGTCTAATACCGGATATGACC	
N. mexicana S/N	(101)	TCGTACTCTGGGATAAGCCTGGGAAAC	KGGGTCTAATACCGGATATGACC	
		151		200
N. mexicana OFN 704	(133)	ACGCTTCGCATGGGGTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCC		
C-03	(133)	ACGCTTCGCATGGGGTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCC		
N. mexicana PCH16S-019	(141)	ACATGTCGCATGGGTGTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCC		
N. mexicana DSM 44952	(126)	ACGCTTCGCATGGGGTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCC		
N. mexicana S/N	(151)	ACGCTTCGCATGGGGTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCC		
		401		450
N. mexicana OFN 704	(383)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG		
C-03	(383)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG		
N. mexicana PCH16S-019	(391)	CTTTCGACTCCGACGAAGCGCAAGTGACGGTAGAGTAGAAGAAGCACCG		
N. mexicana DSM 44952	(376)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG		
N. mexicana S/N	(401)	CTTTCGACAGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGTAGAAGAAGCACCG		
		1001		1050
N. mexicana OFN 704	(983)	TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC	GCAACGA	
C-03	(983)	TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTCAAT	TCCC	GCAACGA
N. mexicana PCH16S-019	(831)	-----		
N. mexicana DSM 44952	(976)	TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC	GCAACGA	
N. mexicana S/N	(1001)	TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC	GCAACGA	

Alineación 3. Secuencias de las cepas *N. mexicana* OFN 704 (referencia), *N. mexicana* PCH16S-019, *N. mexicana* DMS 44952, *N. mexicana* S/N y C-03 en el programa ClustalW.