



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados  
Maestría en Ciencias de la Salud

**“Estudio de variaciones genéticas de cepas de *Nocardia brasiliensis*, basado en técnicas de restricción enzimática”**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Michele Guadalupe Cruz Medrano

Comité de Tutores

Tutora Académica: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Interno: Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Tutor Externo: Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

## INDICE

|       |  | No. página |
|-------|--|------------|
|       | Resumen y Summary  | 5          |
| 1.    | Antecedentes   | 7          |
| 1.1   | Actinomicetos  | 7          |
| 1.1.1 | Generalidades  | 7          |
| 1.1.2 | Metabolismo  | 7          |
| 1.1.3 | Crecimiento  | 7          |
| 1.1.4 | Clasificación  | 8          |
| 1.1.5 | Géneros no patógenos   | 8          |
| 1.1.6 | Géneros patógenos y patologías de interés epidemiológico                                 | 10         |
|       | 1.1.6.1. Actinomicetoma  | 12         |
| 1.2   | Género <i>Nocardia</i>   | 14         |
| 1.2.1 | Generalidades  | 14         |
| 1.2.2 | Metabolismo  | 14         |
| 1.2.3 | Patología  | 14         |
| 1.2.4 | Taxonomía  | 14         |
| 1.2.5 | Métodos empleados para la identificación de <i>Nocardia</i>                              | 15         |
| 1.2.6 | Dificultades en la identificación  | 18         |
| 1.3   | <i>Nocardia brasiliensis</i>   | 20         |
| 1.3.1 | Nomenclatura   | 20         |
| 1.3.2 | Generalidades  | 20         |
| 1.3.3 | Patogenicidad  | 20         |
| 1.3.4 | Taxonomía  | 20         |
| 1.3.5 | Métodos de identificación utilizados para <i>N. brasiliensis</i>                         | 21         |
| 1.3.6 | Problemas taxonómicos  | 22         |
| 1.3.7 | Variabilidad dentro de la especie  | 22         |
| 1.4   | Métodos de restricción enzimática para la determinación de polimorfismos de DNA          | 23         |
| 1.4.1 | Generalidades  | 23         |
| 1.4.1 | Ribotipificación   | 23         |
| 1.4.2 | Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)                     | 23         |
| 1.4.3 | Enzimas de restricción   | 24         |
| 1.4.4 | Comparación de los patrones de bandas  | 24         |
| 1.4.5 | Ventajas de los métodos de restricción enzimática  | 24         |
| 1.4.6 | Estudios antecedentes  | 24         |
| 1.4.7 | Restricciones enzimáticas <i>in silico</i>   | 25         |
| 1.4.8 | Validación de las restricciones enzimáticas <i>in silico</i> obtenidas en otros estudios | 25         |
| 2.    | Planteamiento del Problema   | 27         |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.     | Hipótesis   | 30 |
| 4.     | Objetivos   | 31 |
| 5.     | Justificación   | 32 |
| 6.     | Material y Métodos  | 34 |
| 6.1    | Diseño de estudio   | 34 |
| 6.2    | Criterios de inclusión, exclusión y eliminación                                       | 34 |
| 6.3    | Procedimientos  | 34 |
| 6.3.1  | Colección de cepas de <i>Nocardia</i> incluidas en el estudio                         | 35 |
| 6.3.2  | Reactivación de las cepas   | 35 |
| 6.3.3  | Obtención de biomasa para extracción de ADN   | 36 |
| 6.3.4  | Extracción de ADN de las cepas  | 36 |
| 6.3.5  | Visualización de ADN por electroforesis   | 38 |
| 6.3.6  | Dilución del ADN  | 39 |
| 6.3.7  | Amplificación del gen ARNr 23S por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 39 |
| 6.3.8  | Amplificación del gen ARNr 16S  | 41 |
| 6.3.9  | Corrección de las secuencias genéticas obtenidas a partir de ARNr 16S                 | 43 |
| 6.3.10 | Identificación molecular de cepas por medio del gen ARNr 16S                          | 43 |
| 6.3.11 | RFLP <i>in silico</i>   | 43 |
| 6.3.12 | Interpretación de los patrones de restricción   | 44 |
| 6.4.   | Variables de Estudio  | 44 |
| 6.5.   | Implicaciones Bioéticas   | 47 |
| 6.6.   | Recolección de Datos  | 47 |
| 6.7.   | Análisis Estadístico  | 48 |
| 7.     | Referencias Bibliográficas  | 49 |
| 8.     | Anexos  | 54 |
| 8.1    | Carta de envío del artículo   | 54 |
| 8.2    | Resumen del artículo  | 57 |

### **Aviso de autoría**

Michele Guadalupe Cruz Medrano, autora de la presente Tesis titulada “Estudio de variaciones genéticas de cepas de *Nocardia brasiliensis*, basado en técnicas de restricción enzimática *in silico*” y en representación de los siguientes coautores:

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo

Libre y voluntariamente, declaro que la responsabilidad del contenido del documento, el cual es resultado de un protocolo de investigación, me corresponde y, a su vez, la responsabilidad legal en caso de plagio, deslindando así a la Universidad Autónoma del Estado de México.

## Resumen

El actinomicetoma es una enfermedad crónica extensiva, altamente incapacitante y de mal pronóstico; los principales agentes causales son los géneros *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura* y *Rhodococcus* pertenecientes al orden Actinomycetales. En México, el agente aislado con mayor frecuencia es *Nocardia brasiliensis*, el cual posee peculiaridades en su clasificación taxonómica secundarias a la alta semejanza fenotípica interespecie, causando que durante casi dos siglos fuera poco conocida y reclasificada con base en criterios limitados.

Es hasta el advenimiento de la biología molecular que la identificación de estas bacterias adquiere un alcance mayor, siendo descritas 119 especies hasta la actualidad. *N. brasiliensis* había sido inicialmente descrita como una especie fenotípicamente homogénea, pero en las últimas décadas se ha demostrado que existe en su perfil bioquímico, de susceptibilidad a antibióticos y en algunas secuencias de nucleótidos, una alta variabilidad antes no considerada. El uso de métodos moleculares, por medio de herramientas informáticas o *in silico*, que permitan identificar puntualmente estas diferencias a nivel genético podría ayudar a ampliar los conocimientos que se tienen sobre esta especie, analizar y comparar los patrones genéticos, establecer grupos que formen subespecies o genotipos y, finalmente, explicar la alta variabilidad observada.

Se realizó un estudio descriptivo y transversal, en el cual se identificaron y analizaron los patrones de restricción del gen ARNr 16S de 78 cepas de *N. brasiliensis* aisladas de casos clínicos. El proyecto se inició reactivando las cepas, estas se encontraban conservadas en criotubos a -20°C, para ello se inocularon en agar Sabouraud y agar infusión cerebro corazón con adición de papa al 10% a 37°C por 21 a 35 días. Posteriormente se obtuvo biomasa y se realizó la extracción del material genético por medio del kit Promega Wizard® Genomic. Con el ADN obtenido se amplificó el gen ARNr 16S por medio de PCR. El producto de amplificación fue secuenciado. Se construyeron secuencias consenso por métodos bioinformáticos, con las cuales se realizó la identificación genética de las cepas. Así mismo, las secuencias construidas fueron utilizadas para la realización de las restricciones enzimáticas *in silico* por medio de la herramienta virtual de New England BioLabs® NEBcutter. Se utilizaron las enzimas *NspI* y *SfcI*. Los patrones generados se analizaron en busca de variaciones y se establecieron las agrupaciones correspondientes según las características presentadas. Finalmente, fueron identificados 12 grupos o ribotipos que cumplieron con los criterios de agrupación establecidos, dentro de los cuales se hallaron 63 de las 78 cepas estudiadas; mientras que 6 más pudieron agruparse sin cumplir exitosamente los criterios y 9 más no presentaron semejanzas y no pudieron ser agrupadas.

## Summary

Actinomycetoma is an extensive chronic disease, highly disabling, and poorly diagnosed; the main etiological agents of this pathology are *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, and *Rhodococcus* genus belonging to the Actinomycetales order. In Mexico, the most frequently isolated agent is *Nocardia brasiliensis*, which has peculiarities in its taxonomic classification secondary to the high phenotypic inter-species similarity, causing that for almost two centuries, it was little known and reclassified based on limited criteria.

It was not until the advent of molecular biology that the identification of these bacteria became more widespread, with 119 species described to date. *N. brasiliensis* was initially described as a phenotypically homogeneous species. However, in recent decades it has been shown that there is significant variability in its biochemical profile, antibiotic susceptibility, and nucleotide sequences. The use of molecular biology techniques and computational or *in silico* tools that allow the precise identification of these differences at the genetic level could help to expand the knowledge we have about this species, analyze and compare genetic patterns, find clusters, subspecies or genotypes and, finally, explain the high variability observed.

A descriptive and cross-sectional study was carried out, in which the 16S rRNA gene restriction patterns of 78 strains of *N. brasiliensis* isolated from clinical cases were identified and analyzed. The project began by reactivating the strains, which were preserved in cryotubes at -20°C, inoculated on Sabouraud agar and Brain Heart Infusion agar with the addition of 10% potato at 37°C for 21 to 35 days. Subsequently, biomass was obtained, and genetic material was extracted using the Promega Wizard® Genomic kit. The DNA obtained was used to amplify the 16S rRNA gene by PCR. The amplification product was sequenced, then consensus sequences were constructed by bioinformatics methods, and the genetic identification of the strains was performed; the constructed sequences were also used to perform *in silico* enzymatic constraints using the virtual tool NEBcutter from New England BioLabs® with the enzymes *NspI* and *SfcI*. The generated patterns were analyzed for variations, and the corresponding clusters were established according to the presented characteristics. Finally, 12 groups or ribotypes were identified according to the grouping criteria, including 63 of the 78 strains studied, while 6 more could be grouped without successfully meeting the criteria, and 9 more did not show similarities and could not be grouped.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Actinomicetos

#### 1.1.1. Generalidades

La palabra actinomiceto tiene su origen en los vocablos latinos *aktino* “sol o rayo” y *mycete* “hongo”, haciendo referencia a un hongo con filamentos en distribución radiada (1).

Son organismos procariotas, por lo cual no tienen membrana nuclear y su material genético se halla en forma libre dentro del citoplasma, con un alto porcentaje en el contenido de bases nitrogenadas G y C (guanina y citosina) (2); poseen ribosomas, no cuentan con aparato de Golgi, retículo endoplásmico ni mitocondrias. Su membrana celular está exenta de ergosteroles y la pared contiene ácido murámico. Su tamaño es pequeño, midiendo menos de 1 micrómetro. Se dividen por fisión binaria, formando micelios microsifonados (menores de 1 micrómetro de diámetro), cuyas estructuras filamentosas se fragmentan y generan formas bacilares o cocoides. Pueden reproducirse también como esporas con gran resistencia a la humedad, a la sequía y al calor (1) (3).

Son microorganismos que habitan en el suelo, lagos, ríos y océanos. Pueden relacionarse con otros seres vivos, frecuentemente plantas, animales y humanos, como parásitos o simbioses, aunque es común su presencia en material orgánico en descomposición (2). En muestras de suelo se suelen hallar con una distribución de 70% a 90% de *Streptomyces*, 10% a 30% de *Nocardia* y 1% a 15% de *Micromonospora* (4).

#### 1.1.2. Metabolismo

Se trata de seres heterótrofos, en su mayoría saprófitos, que pueden ser aerobios o anaerobios, según el género, metabolizan nitrógeno y carbono y mineralizan la materia orgánica. Producen una vasta colección de metabolitos secundarios que tienen impacto en su ambiente natural y en su relación con otros organismos (4). Producen geosmina y metilisoborneol que son los componentes que dan el olor característico a “tierra mojada” en exteriores, y en agua de consumo humano pueden causar cambios en su coloración y en su sabor (2).

#### 1.1.3. Crecimiento

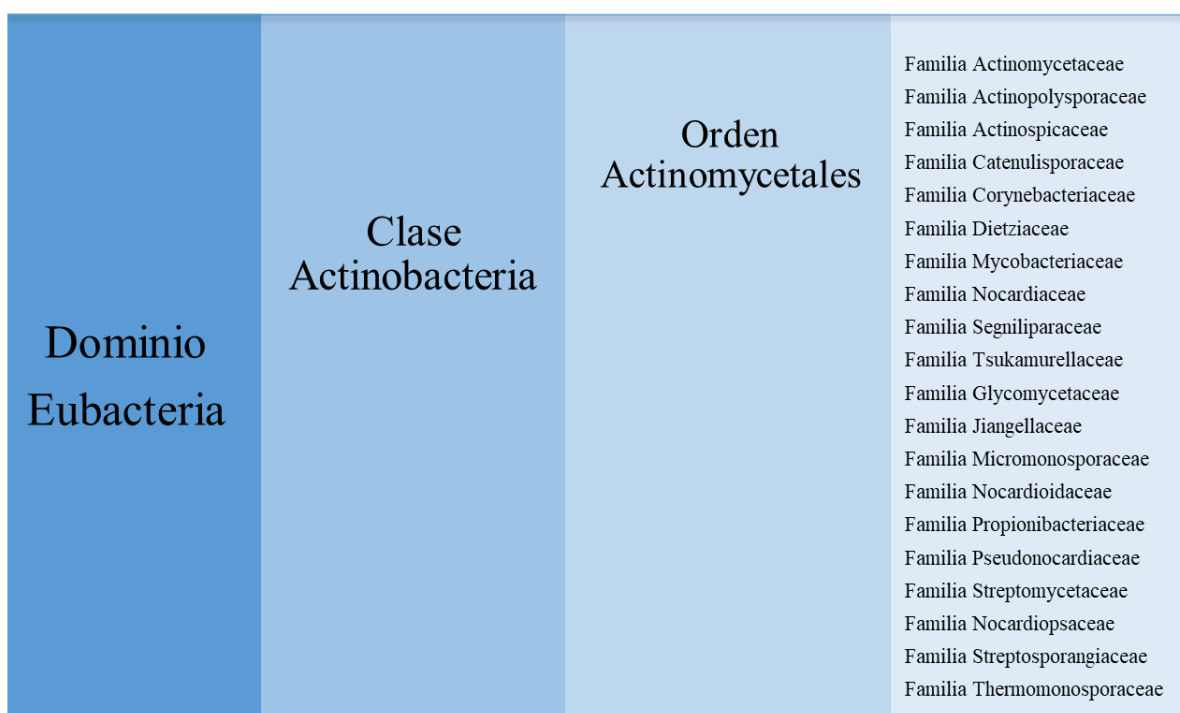
Tanto en su medio natural como en medios de cultivo, se consideran de lento crecimiento, razón que dificulta su observación (2). De modo experimental, se utilizan medios de cultivo Sabouraud

con actidione, infusión cerebro-corazón (HBI o Hearth-Blood Infusion) y en algunos casos, como *A. madurae*, en Lowenstein-Jensen (1).

Cuando crecen en medios sólidos, forman colonias acuminadas y en los medios líquidos, constituyen formas ramificadas con fragmentación de micelios. Es común hallar formación de micelio aéreo que se puede verse sobre las colonias como una estructura blanquecina, difusa y que sobresale del medio de cultivo (1) (3).

#### 1.1.4. Clasificación

Pertenecen al dominio Eubacteria, clase Actinobacteria y orden Actinomycetales. Se subdividen en 195 géneros, de los cuales 190 se clasifican en 20 familias y 5 se hallan sin familia asignada, como se muestra en la figura 1 (5).



**Figura 1.** Familias del orden Actinomycetales

#### 1.1.5. Géneros no patógenos

La mayoría de las actinobacterias no son patógenas, por el contrario, poseen propiedades que pueden ser benéficas para el humano, otras especies animales y vegetales o el ecosistema. En los últimos años, especialmente con las herramientas biotecnológicas, se ha potenciado su utilidad (2) (4) (6). Algunas de las aplicaciones se mencionan a continuación.



### *Aplicaciones biotecnológicas*

La producción de metabolitos secundarios y moléculas bioactivas, como se describe a continuación, ha llamado la atención de los investigadores desde su descubrimiento, encontrándose que pueden ser aplicados en distintas áreas con beneficio al humano.

### *Producción de antibióticos*

Se estima que al menos el 70% de los antibióticos son producidos a partir de especies de actinobacterias (2). *Streptomyces* es el principal género usado con esta finalidad, entre los compuestos que se han aislado a partir de sus metabolitos, figuran la estreptomycinina, tetraciclinas, aminoglucósidos, betalactámicos, eritromicina, rifampicina, neomicina, ácido clavulánico, cloranfenicol y kanamicina. Sin embargo, la presencia de patologías causadas por bacterias multirresistentes ha dirigido el interés en la búsqueda de sistemas biosintéticos que lleven a la producción de nuevas moléculas que puedan actuar contra las cepas resistentes (6).

### *Producción de medicamentos usados en oncología*

Antraciclinas y estreptomycinina como fármacos utilizados en las terapias oncológicas son producidos por actinomicetos. Se han aislado, además, algunos inhibidores enzimáticos como retrostatina y estreptonigrina que actúan sobre la transcriptasa inversa (2) (4).

### *Agricultura*

Distintos géneros de actinomicetos han sido estudiados y actualmente aplicados en la industria agrícola por los beneficios que sus productos tienen en la nutrición, crecimiento y protección de especies vegetales. Se sabe también que pueden contribuir a la supresión del crecimiento de especies patógenas (2).

Se pueden mencionar los siguientes géneros con sus funciones (4):

- A. *Frankia*: Capacidad de fijar el nitrógeno del ambiente para su posterior utilización como nutrimento para la planta.
- B. *Micromonospora*: Activación de los sistemas de defensa de las plantas a partir de la producción de enzimas, lo cual puede ser de utilidad para evitar enfermedades.

### *Biorremediación*

La restauración de sitios contaminados es un tema prioritario en zonas donde la degeneración de los ecosistemas no ha podido ser evitada. Se sabe que los actinomicetos, al realizar modificaciones

químicas, son capaces de degradar polímeros complejos, lignina, celulosa, hemicelulosa, pectina, queratina, quitina, agar, alginatos, aceites, hidrocarburos y material de las paredes celulares de hongos (2).

Los géneros que participan en esta aplicación son los siguientes (4):

- A. *Streptomyces*: Degradación de queratina, látex, pectina y compuestos aromáticos.
- B. *Arthrobacter*: Posee la capacidad de degradar sustancias como pesticidas y herbicidas.
- C. *Rhodococcus*: Degradación de hidrocarburos, benceno, algunos detergentes y bifenilos policlorados, además de la producción de bio-emulsificantes.
- D. *Frankia*: Este microorganismo puede ser utilizado para especies vegetales que son aplicadas en sitios contaminados con metales pesados o compuestos inorgánicos.
- E. *Thermomonospora*: Muestra actividad en la descomposición de composta y desechos urbanos.
- F. *Nocardia*: Degradación de hidrocarburos aromáticos mediante hidroxilación.

#### 1.1.6. Géneros patógenos y patologías de interés epidemiológico

Son pocos los que causan enfermedades, aunque éstos pueden actuar sobre humanos, animales y algunas plantas (4). La clasificación modificada del manual de Bergey incluye a los principales géneros patógenos (1), que pueden ser distribuidos en dos grupos.

- 1) Sin formación de micelio: *Mycobacterium* y *Corynebacterium*
- 2) Con formación de micelio
  - A. Aerobios: *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Dermatophilus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardiosis* y *Thermomonospora*.
  - B. Anaerobios: *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* y *Rothia*.

Los seis géneros patógenos de relevancia epidemiológica en humanos son *Actinomadura*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* que causan patologías como actinomicetoma, actinomicosis, nocardiosis, tuberculosis y lepra. Las características fenotípicas, así como la relación de las patologías causadas por especie se muestran en las tablas 1 y 2 (1) (7) (8).

**Tabla 1.** Géneros patógenos de Actinomycetales

| Género               | Consumo de oxígeno        | Tinción Gram  | Tinción Ziehl-Neelsen            | Producción de micelio                         | Morfología   | Reproducción             | Especies patógenas incluídas en el género   |
|----------------------|---------------------------|---------------|----------------------------------|---|--|--------------------------|---|
| <i>Actinomadura</i>  | Aerobio                   | Gram positivo | No ácido-alcohol resistente      | Sí  | Cocoide formando cadenas pequeñas                        | Fisión binaria y esporas | <i>A. madurae</i><br><i>A. pelletieri</i>   |
| <i>Actinomyces</i>   | Anaerobio o microaerófilo | Gram positivo | No ácido-alcohol resistente      | Filamentos que no se estructuran en micelios. | Cocoides   | Fisión binaria           | <i>A. israelii</i>  |
| <i>Nocardia</i>      | Aerobio                   | Gram positivo | Ácido-alcohol resistente parcial | Sí  | Filamentosa, con tendencia a romperse en cocos o bacilos | Fisión binaria y esporas | <i>N. brasiliensis</i><br><i>N. asteroides</i><br><i>N. farcinica</i><br><i>N. caviae</i> |
| <i>Mycobacterium</i> | Aerobio                   | Gram positivo | Ácido-alcohol resistente         | No  | Bacilos  | Fisión binaria           | <i>M. tuberculosis</i><br><i>M. leprae</i>  |
| <i>Rhodococcus</i>   | Aerobio                   | Gram positivo | Ácido-alcohol resistente parcial | Sí  | Cocoide  | Fisión binaria           | <i>R. equi</i>  |
| <i>Streptomyces</i>  | Aerobio                   | Gram positivo | No ácido-alcohol resistente      | Sí  | Cocoides, zarcillos y espirales                          | Fisión binaria y esporas | <i>S. somaliensis</i><br><i>S. paraguayensis</i><br><i>S. sudanensis</i>                  |

**Tabla 2.** Principales patologías de interés epidemiológico causadas por actinomicetos

| Género               | Especies patógenas comunes  | Patología causada             |
|----------------------|---|-------------------------------|
| <i>Actinomadura</i>  | <i>A. madurae</i><br><i>A. pelletieri</i>   | Actinomicetoma                |
| <i>Actinomyces</i>   | <i>A. israelii</i>  | Actinomicosis                 |
| <i>Nocardia</i>      | <i>N. brasiliensis</i><br><i>N. asteroides</i><br><i>N. farcinica</i><br><i>N. Caviae</i> | Actinomicetoma<br>Nocardiosis |
| <i>Mycobacterium</i> | <i>M. tuberculosis</i><br><i>M. Leprae</i>  | Tuberculosis<br>Lepra         |
| <i>Rhodococcus</i>   | <i>R. equi</i>  | Actinomicetoma                |
| <i>Streptomyces</i>  | <i>S. somaliensis</i><br><i>S. paraguayensis</i><br><i>S. sudanensis</i>                  | Actinomicetoma                |

### 1.1.6.1. Actinomicetoma

Se trata de un síndrome anatomoclínico constituido por inflamación crónica, deformidad de la zona afectada con múltiples lesiones y fístulas que drenan un contenido seropurulento donde se halla al agente causal en forma de “granos”. Estos agentes pertenecen a cuatro géneros, que se enuncian con sus respectivas especies (1):

- 1) *Nocardia*: *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. mexicana*, *N. otitiscaviarum* y *N. transversalis*.
- 2) *Actinomadura*: *A. madurae*, *A. pelleteri* y *A. vinaceae*.
- 3) *Streptomyces*: *S. somaliensis* y *S. sudanensis*
- 4) *Rhodococcus*: *R. equi*

Predomina en las regiones que se encuentran sobre el Trópico de Cáncer, especialmente África, Asia y Latinoamérica, con climas subtropicales y tropical senegalés. Los países donde más casos se registran son India, Sudán, Somalia, Senegal, Nigeria, Chad, Níger, México, Venezuela, Colombia, Brasil, Argentina, Guatemala y El Salvador. Se presenta mayormente en hombres con una relación 3:1 respecto a las mujeres. Se ha visto un patrón especial en las personas que trabajan en el campo y habitan en áreas rurales con escaso acceso a servicios básicos en la vivienda (1).

La vía de entrada suele ser a través de una solución de continuidad de la piel causada por algún componente vegetal, madera, piedras o animales donde el microorganismo habite; también ocurre cuando las heridas se contaminan con tierra. El periodo de incubación del microorganismo puede ser de meses hasta años, presentando un crecimiento lento. Una vez desarrollados en el organismo, los hongos o actinomicetos causarán una reacción inflamatoria local a expensas de polimorfonucleares, seguida de fibrosis y neovascularización (3).

El crecimiento de estos agentes culminará en forma de granos; en actinomicetos se ha demostrado que producen un polisacárido ácido sulfatado y un polisacárido neutro que bloquean el reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígeno, volviendo ineficaz la respuesta inmunitaria adaptativa. Estos granos seguirán el camino de las fístulas para llegar al exterior en forma de exudado seropurulento. Es el mismo periodo de incubación el que determina el tiempo en que las lesiones comienzan a presentarse, siendo el sitio de inoculación el mismo que de presentación, aunque el más reportado sea en el pie (3).

La presentación de la enfermedad iniciará con aumento de volumen progresivo que llevará a la deformidad de la región, sobre las lesiones aparecen fístulas con drenaje de los microorganismos en forma de granos. Además, se puede observar un característico borde mamelonado alrededor de las fístulas. Pueden aparecer costras melicéricas y ulceraciones, así como cicatrices hipopigmentadas o hiperpigmentadas retráctiles (1).

La extensión de las lesiones irá en aumento conforme la enfermedad se desarrolla, extendiéndose por contigüidad y afectando huesos del tarso y metatarso, vértebras con diseminación a médula espinal, costillas, pleura y pulmón, y cualquier otro tejido según sea la localización de las lesiones. Pueden ocurrir diseminaciones en sitios lejanos de la lesión primaria a través de vasos sanguíneos y linfáticos (3).

El diagnóstico se realiza con la visualización al microscopio de los granos, citodiagnóstico con aspiración por aguja fina o cultivos donde se evidencie el microorganismo causal. En actinomicetomas no se recomienda la resección quirúrgica por el riesgo de diseminación, en cambio se prefieren tratamientos conservadores a base de largos esquemas de antibióticos como sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol 80/400 mg, estreptomina 1g/día evaluando la ototoxicidad y amoxicilina con ácido clavulánico 500mg/125mg; pudiendo durar los tratamientos desde 6 meses hasta 2 años (1).

La enfermedad por sí misma se extiende hasta planos profundos, pudiendo ocasionar inmovilidad, secuelas severas según el sitio de las lesiones e incluso la muerte. Puede haber afección pulmonar o nerviosa de la enfermedad, cursando con mal pronóstico (3).

La última actualización epidemiológica exhaustiva acerca del actinomicetoma en México fue realizada en 2013 por López Martínez y col. (9) donde se recopilaron los datos de once centros de diagnóstico micológico, encontrando que la prevalencia fue de 3,796 casos, con una incidencia de 73 casos por año. A su vez, *N. brasiliensis* representa el agente causal en el 65.58% de los casos, es decir, en 2,489, siendo el más importante de todos. Posteriormente se encuentran *Actinomadura madurae* con el 7.93%, *Streptomyces somaliensis* con 1.02% y *N. asteroides* con 0.71%.

## 1.2. Género *Nocardia*

### 1.2.1. Generalidades

El término *Nocardia* fue acuñado en 1889 por Vittore Trevisan como reconocimiento al trabajo de Edmund Nocard quien, en 1888, en la isla de Guadalupe, aisló en muestras de ganado con enfermedad linfática al microorganismo que describió como *Streptothrix farcinica* y que hoy es conocido como *Nocardia farcinica* (3).

Se trata de actinomicetos aerobios, Gram positivos y ácido-alcohol resistentes debido a que producen ácido micólico. Su estructura química celular está formada principalmente por peptidoglucanos, quitina, ácidos micólicos y quinona isoprenoide, los fosfolípidos de membrana son mayoritariamente ácidos tuberculoesteáricos y la pared celular es dependiente de arabinosa y galactosa. Al crecer, forman micelio microsifonado que se fractura en estructuras bacilares y cocoides. Pueden, además, producir granos como la forma compacta de los filamentos (3).

Viven en el ambiente, en suelo, en agua y en materia orgánica en descomposición. Se ha descrito que su predominio por regiones geográficas es la siguiente: clima templado para *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. absessus* y *N. nova*; mientras que el clima tropical húmedo es benéfico para el crecimiento de *N. brasiliensis*, *N. caviae* y *N. transvalensis* (1).

### 1.2.2. Metabolismo

Tienen la capacidad de producir lisis de hidrocarburos de cadena larga, además de diésel, parafina y asfalto (2).

### 1.2.3. Patología

Se considera a *Nocardia* como un patógeno oportunista, desarrollando enfermedad principalmente en pacientes inmunodeprimidos. Terapias como el trasplante de órganos o tejidos, enfermedades autoinmunes y neoplasias propician el desarrollo del actinomiceto (10). Las principales especies patógenas de *Nocardia* se encuentran en la Tabla 3.

### 1.2.4. Taxonomía

El género *Nocardia* pertenece a la familia *Nocardiaceae*, orden de los Actinomycetales, clase Actinobacteria, phylum Actinobacteria y dominio Eubacteria. Existen, actualmente, 119 especies descritas de *Nocardia* según la Lista de Nombres Bacterianos con Nomenclatura Vigente (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature o LPSN) (5).

**Tabla 3.** Especies de *Nocardia* reportadas como patógenas (11)

| Nombre de la especie        |                           |                          |                              |                          |
|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>N. abscessus</i>         | <i>N. beijingensis</i>    | <i>N. exalbida</i>       | <i>N. neocaledoniensis</i>   | <i>N. sienata</i>        |
| <i>N. africana</i>          | <i>N. blacklockiae</i>    | <i>N. farcinica</i>      | <i>N. niigatensis</i>        | <i>N. takedensis</i>     |
| <i>N. amamiensis</i>        | <i>N. boironii</i>        | <i>N. harenae</i>        | <i>N. ninae</i>              | <i>N. terpenica</i>      |
| <i>N. amikacinitolerans</i> | <i>N. brasiliensis</i>    | <i>N. higoensis</i>      | <i>N. niwae</i>              | <i>N. testacea</i>       |
| <i>N. anaemiae</i>          | <i>N. brevicatena</i>     | <i>N. ignorata</i>       | <i>N. nova</i>               | <i>N. thailandica</i>    |
| <i>N. aobensis</i>          | <i>N. carnea</i>          | <i>N. inohanensis</i>    | <i>N. otitidiscaviarum</i>   | <i>N. transvalensis</i>  |
| <i>N. araoensis</i>         | <i>N. cerradoensis</i>    | <i>N. jinanensis</i>     | <i>N. paucivorans</i>        | <i>N. vermiculata</i>    |
| <i>N. arthritidis</i>       | <i>N. concava</i>         | <i>N. kroppenstedtii</i> | <i>N. pneumoniae</i>         | <i>N. veterana</i>       |
| <i>N. arizonensis</i>       | <i>N. cyriacigeorgica</i> | <i>N. kruczakiae</i>     | <i>N. pseudobrasiliensis</i> | <i>N. vulneris</i>       |
| <i>N. asiatica</i>          | <i>N. donostiensis</i>    | <i>N. mexicana</i>       | <i>N. puris</i>              | <i>N. wallacei</i>       |
| <i>N. asteroides</i>        | <i>N. elegans</i>         | <i>N. mikamii</i>        | <i>N. shinanonensis</i>      | <i>N. yamanashiensis</i> |

### 1.2.5. Métodos empleados para la identificación de *Nocardia*

La identificación de estos actinomicetos se realiza inicialmente con las pruebas fenotípicas y posteriormente con las pruebas moleculares, siendo éstas últimas más certeras a causa de las peculiaridades que posee el género.

#### Métodos fenotípicos

##### *Cultivos y Tinciones*

Crecen en medios aerobios a 28°C (10), especialmente en agar glucosado de Sabouraud, infusión cerebro-corazón (BHI), Lowenstein-Jensen, medio de Bennett, Middlebrook y BCP (12). Su crecimiento es lento, requiriendo su mantenimiento entre 4 a 6 semanas, aunque forman colonias visibles en 3 a 5 días (1).

Su aspecto es acuminado, granular, de elevación pulvinada y con contorno lobulado, la coloración varía entre amarillo y tonalidades de anaranjado, aunque la superficie puede verse blanquecina a expensas de la hifa aérea y desprende un olor característico a humedad (13). Es importante que los laboratorios estén informados de la sospecha de *Nocardia* para que las muestras sean procesadas adecuadamente y en los tiempos necesarios para esta bacteria (14). Es aconsejado realizar tinción de Gram puesto que se trata de bacterias Gram positivas, además de tinción de Ziehl-Neelsen para diferenciar de otros actinomicetos no ácido-alcohol resistentes. Al observarse al microscopio, se

evidencia el micelio microsifonado, las ramificaciones en los filamentos y las figuras bacilares y cocoides causadas por la fragmentación de éstos (13).

### *Pruebas bioquímicas*

Existen distintas pruebas metabólicas que pueden realizarse a las especies de *Nocardia*, algunas de las más comunes son las siguientes (15) (1):

- 1) Crecimiento en fuentes de carbono como L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, maltosa, D-manitol, manosa, L-ramnosa y sorbitol.
- 2) Crecimiento en agar Bennett a 45°C
- 3) Ureasa
- 4) Catalasa
- 5) Descomposición de sustratos como adenina, caseína, hipoxantina, tirosina y xantina.

### *Antibiograma y creación de complejos de especies N. asteroides*

Para 1988 se tenía claro que las especies identificadas previamente como *Nocardia asteroides* poseían diferencias significativas en su antibiograma, sin conocerse la causa de este hecho. El estudio realizado por Wallace y col. (16) en el mismo año confirmó esa observación, demostró la heterogeneidad dentro de la misma especie y obtuvo seis patrones de susceptibilidad a antibióticos que sirvieron para clasificar posteriormente a *N. asteroides* en sus respectivos complejos con base en estas características.

Los seis grupos son los siguientes (16):

- 1) Susceptible a ampicilina, carbenicilina y cefalosporinas de amplio espectro.
- 2) Susceptible a ampicilina, carbenicilina, cefalosporinas de amplio espectro y ciprofloxacino.
- 3) Susceptible a ampicilina y eritromicina pero resistente a carbenicilina.
- 4) Susceptible a ciprofloxacino pero resistente a todos los aminoglucósidos, incluyendo amikacina.
- 5) Susceptible a ciprofloxacino e imipenem pero resistente a penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y a todos los aminoglucósidos excepto amikacina.
- 6) Susceptible a cefalosporinas de amplio espectro, pero resistente a penicilinas.



### *Patrón de lípidos de membrana*

Considerando las características estructurales y bioquímicas de los actinomicetos, se ha buscado establecer un patrón basado en el perfil de lípidos entre diferentes especies para facilitar su identificación. McNaab y col. (17) obtuvieron índices de similitud para perfiles de ácidos grasos utilizando el software MIS, que revelaba la semejanza que tenía una cepa estudiada con una cepa de referencia y con una base de datos que incluía perfiles lipídicos.

Aunque se hallaron ventajas en el uso de esta prueba, pues es rápida y práctica, los resultados publicados también mostraron sus limitaciones, reportando que fue posible reconocer sólo el 33.5% de las cepas estudiadas; además de que la heterogeneidad en el perfil de lípidos de membrana dentro de la misma especie no podía confirmar la existencia de subespecies por la posibilidad de que aquello se debiera a variables en el crecimiento de las cepas que causaran interferencia en los resultados (17).

### Métodos moleculares

El auge de la biología molecular en el último siglo llevó al desarrollo y aplicación de técnicas que permiten estudiar y comprender características específicas de los seres vivos. Las reconsideraciones taxonómicas surgidas a partir del uso de métodos moleculares para la identificación de especies microscópicas evidencian las limitaciones que se tenían al realizar clasificaciones meramente fenotípicas. La aplicación de estos métodos, a través de diversos estudios, permite no sólo la discriminación entre cepas estrechamente relacionadas sino la descripción de especies nuevas (18).

El alcance en el conocimiento del género *Nocardia* puede manifestarse en el número de especies conocidas, siendo que en 1980 se describían 20 especies en la Lista de Nombres Aprobados de Bacterias y en 2019 se encuentran 119 especies registradas en la Lista de Nombres Bacterianos con Nomenclatura Vigente (5).

### *Secuenciación del gen ARNr 16S*

El gen de ARNr 16S tiene una baja tasa de mutación a lo largo de la evolución, lo cual permite la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas. Se considera que dos cepas pertenecen a la misma especie cuando muestran una similitud mayor al 98.7% en la secuencia obtenida (19). Actualmente, este método es considerado el estándar de oro para la identificación molecular de

*Nocardia*. Cuando los resultados son difíciles de interpretar, es recomendable realizar la secuenciación de otros genes para la construcción de árboles filogenéticos (15).

#### *Secuenciación del gen hsp65*

Al realizar una secuenciación de hsp65 en cepas de *Nocardia*, es posible identificar al menos al 90% a nivel especie con una concordancia de 0.867 respecto al estándar de oro. El gen hsp65 muestra disimilitud genética en un 4 %, lo cual lo hace favorable para su uso en identificación de especies pertenecientes al mismo género. Para algunas especies concretas se recomienda el uso del gen hsp65 sobre ARNr 16S, específicamente el caso de *N. cyriacigeorgica*. La principal desventaja en la realización de esta secuenciación es la baja disponibilidad de datos en la mayoría de las bases de acceso público (20).

#### *Secuenciación del gen gyrB*

Esta técnica utiliza el gen de la subunidad gyrB de la ADN girasa para su secuenciación y posterior comparación de resultados. En distintas especies de *Nocardia*, se ha encontrado que la similitud obtenida en la secuencia del gen es de 82.4% a 99.9%. Siendo que en *Nocardia paucivorans* y *Nocardia brevicatena* la similitud es del 99.5%, al igual que entre *Nocardia carnea* y *Nocardia flavorosea*. Sin embargo, el uso de la subunidad gyrB aún muestra limitaciones (21).

#### *Tipificación multilocus de secuencias*

Recientemente, se ha probado el uso de tipificación multilocus de secuencias para ayudar a resolver el problema persistente en la taxonomía de *Nocardia*. Este género bacteriano tiene una amplia variedad genética, demostrándose que al menos el 20.5% de las cepas pueden contener dentro de su locus un alelo que no pertenece a su especie, siendo que para los genes más secuenciados se halla esta condición en 1.6% para secA1, 17.4% para hsp65, 3.2% para rpoB y 1.6% para gyrB. A pesar de que la tipificación multilocus de secuencias muestra buenos resultados, su realización es compleja, limitando su uso (22).

#### 1.2.6. Dificultades en la identificación

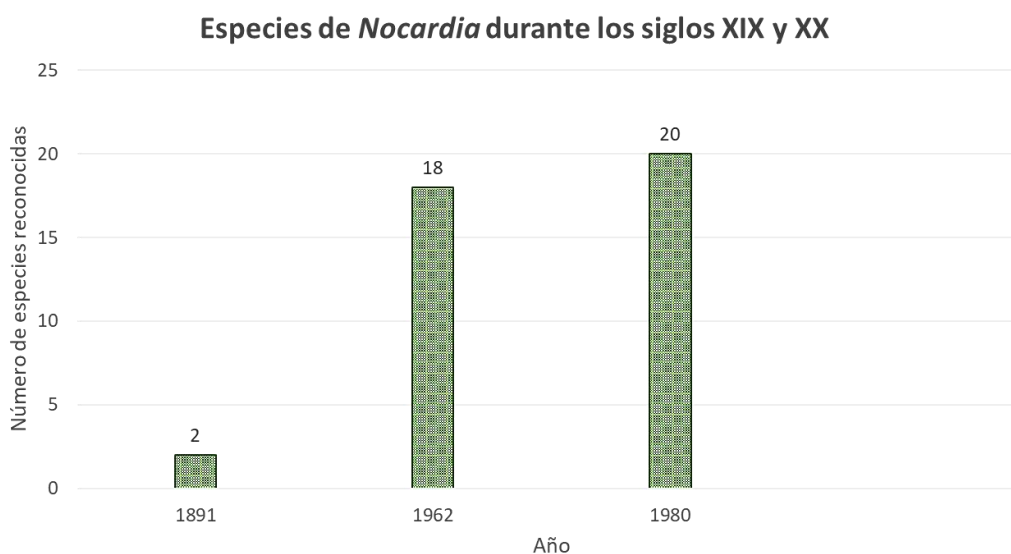
Después de su publicación en 1889, la integración de nuevas especies a este género fue más bien paulatina (Figura 2), contando con 18 especies para 1962, mismo año en que Gordon y Mihm (23) realizan pruebas fenotípicas a *N. asteroides* y *N. farcinica*, sin encontrar diferencia alguna,

quedando su escrito como antecedente de la alta similitud que hay entre estas especies y la dificultad de diferenciarlas con pruebas microscópicas tradicionales.

Para 1980, cuando se publica la primera Lista de Nombres Aprobados de Bacterias, se tenían registradas 20 especies de *Nocardia* (24), encontrando en 1988 que dentro de *N. Asteroides* se podían incluir al menos seis grupos distintos clasificados en esta misma especie (16).

El desarrollo de los métodos de biología molecular tuvo una influencia significativa en las técnicas utilizadas para la identificación de especies bacterianas, incluyendo a *Nocardia*, así para 2006 se habían realizado ya secuenciaciones de 65-kDa de los genes ARNr 16S y hsp65 en los seis complejos de *N. asteroides*, confirmando su disimilitud interespecie aún con la alta semejanza fenotípica (25).

En los últimos años, el estudio de *Nocardia* se realiza por medio de secuenciaciones genéticas, con el fin de obtener más datos de las distintas especies existentes, así como la posible identificación de especies nuevas. Entre las especies de interés epidemiológico y taxonómico se encuentra *Nocardia brasiliensis* (25) (11).



**Figura 2.** Especies de *Nocardia* reconocidas durante los siglos XIX y XX

### 1.3. *Nocardia brasiliensis*

#### 1.3.1. Nomenclatura

La especie *Nocardia brasiliensis* fue descrita inicialmente por Lindenberg en 1909 (26) con el nombre de *Discomyces brasiliensis*, además recibiendo otros nombres en los años subsecuentes, como *Streptothrix brasiliensis*, *Oospora brasiliensis*, *Actinomyces brasiliensis* y *Actinomyces violaceus subsp. brasiliensis* (27). En la primera publicación de la Lista de Nombres Aprobados de Bacterias, aparece con la nomenclatura actual.

#### 1.3.2. Generalidades

La descripción completa de la especie fue publicada por Gordon y Mihm (23) Al crecer en los medios de cultivo adecuados, macroscópicamente forman colonias acuminadas, secas y arrugadas, se evidencia la presencia de micelio aéreo por las estructuras blanquecinas en la superficie de la colonia, adquieren coloración desde amarillo claro hasta anaranjado y excepcionalmente ámbar o café. Microscópicamente son Gram positivas y ácido-alcohol resistentes, muestran largos filamentos ramificados y forman micelios rizoides o entrelazados. El micelio aéreo se observa como estructuras cortas, rectas, largas o ramificadas con tendencia a fusionarse (23).

El genoma de *N. brasiliensis* tiene un total de 9, 436, 348 pares de bases, mostrando ser una bacteria patógena con un genoma largo a comparación de otros patógenos humanos. Se encuentran 8,414 secuencias codificantes de proteínas, 51 para ARNt y 3 para el operón de ARNr 16S-23S-5S. El porcentaje de G+C (Guanina y citocina) contenido en el genoma alcanza el 68% (28).

Las características metabólicas que la distingue de otras especies de actinomicetos se muestran en la Tabla 4.

#### 1.3.3. Patogenicidad

En 2013 se estimó que la prevalencia de actinomicetoma en México es de 3,796 casos, donde 3,057 (80.53%) son causados por el género *Nocardia*, siendo *N. brasiliensis* el agente causal más común con 2,489 (65.58%) casos. Lo anterior muestra que *N. brasiliensis* no sólo es la especie de *Nocardia* que se presenta con más frecuencia, sino también el actinomiceto con mayor relevancia clínica (9).

#### 1.3.4. Taxonomía

*N. brasiliensis* pertenece al género *Nocardia*, familia Nocardiaceae, suborden Corynebacterineae, orden Actinomycetales, clase Actinobacteria, phylum Actinobacteria y dominio Eubacteria (5).

**Tabla 4.** Principales características fisiológicas de *N. brasiliensis* (23)

| Características fisiológicas de <i>N. brasiliensis</i> |   |                                 |  |
|--|---|---------------------------------|--|
| Presencia de:  |   | Ausencia de:                    |  |
| Descomposición de:                                     | Caseína<br>Tirosina   | Descomposición de:              | Xantina  |
| Formación de ácido a partir de:                        | Inositol<br>Manitol<br>Glucosa<br>Glicerol                          | Formación de ácido a partir de: | Adonitol<br>Arabinosa<br>Eritritol<br>Lactosa<br>Maltosa<br>$\alpha$ -metil-D-glucosido<br>Rafinosa<br>Ramnosa<br>Sorbitol<br>Xilosa |
| Uso de fuentes de carbono como:                        | Acetato<br>Citrato<br>Malato<br>Propionato<br>Piruvato<br>Succinato | Uso de fuentes de carbono como: | Benzoato   |

#### 1.3.5. Métodos de identificación utilizados para *N. brasiliensis*

A pesar de que se ha comprobado la utilidad de los métodos moleculares para la identificación veraz de microorganismos como *N. brasiliensis* (18), en muchos laboratorios no se realizan estos estudios debido a la falta de recursos aunado a los altos costos, siendo que la identificación de género se realiza con la observación macroscópica y microscópica de las colonias, mientras que para determinar la especie se utilizan las pruebas bioquímicas como apoyo. La descomposición de caseína positiva es comúnmente usada como marcador para diferenciar a las especies *N. brasiliensis*, sin embargo, se ha observado que esta característica metabólica está presente en microorganismos con relación evolutiva con *N. brasiliensis* y no como propia de la especie (12).

Los perfiles de susceptibilidad a antibióticos aparecen aún como métodos auxiliares de identificación, habiendo encontrado para *N. brasiliensis* susceptibilidad a amikacina, trimetoprim con sulfametoxazol y resistencia a imipenem, ceftriaxona y pristinamicina (12) (29).

### 1.3.6. Problemas taxonómicos

Antes del desarrollo de los métodos moleculares, las especies de *Nocardia* eran frecuentemente reportadas de modo incorrecto a causa de la gran semejanza fenotípica que poseen. Al realizarse, contemporáneamente, secuenciaciones completas del gen ARNr 16S, así como de las primeras 500 pares de bases del mismo gen, se pudieron hallar, además, que distintas especies muestran semejanzas en la secuencia de 500 pares de bases, como ocurre con *N. brasiliensis* y *N. vulneris* (11). Es notorio que el estudio de la taxonomía de *Nocardia* es aún extenso y complejo.

En 2014, la especie *N. vulneris* fue descrita por primera vez, encontrándose en ocho muestras de casos clínicos de actinomicetomas en Estados Unidos y Canadá, las cuales fueron aisladas y secuenciadas genéticamente, mostrando un patrón estable e idéntico entre todas ellas. Por medio del gen ARNr 16s se halló una similitud del 99.37% con *N. brasiliensis*, sin embargo, por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF y relación ADN-ADN se hallaron diferencias con esta especie (30).

### 1.3.7. Variabilidad dentro de la especie

Diferencias entre cepas de la misma especie han sido observadas antes y no es inusual ver pequeñas variaciones entre los perfiles de pruebas fisiológicas, así como en su genotipo, sugiriendo la posibilidad de gran variabilidad en la misma especie o especies distintas siendo reportadas como *N. brasiliensis* por su alta semejanza (12).

Variaciones dentro de los perfiles de susceptibilidad a antibióticos han sido encontrados aun cuando en las características bioquímicas y fisiológicas no muestren diferencias y se haya demostrado que la resistencia no está relacionada con la producción de metalo- $\beta$ -lactamasas (M $\beta$ L). La causa de que cepas de *N. brasiliensis* presenten susceptibilidad a imipenem cuando deberían resultar en resistencia al fármaco, parece hallarse en una sustitución en la posición 107, 381 y 456 donde T, A y A cambian a G, A o C y C. Considerándose que las cepas con la presencia de la mutación representaron el 30.3% del total estudiado, es aceptable evidenciar la existencia de dos grupos con variación dentro de la misma especie con base en su perfil de susceptibilidad a imipenem (31).

Secuenciaciones de genes constitutivos como el de la proteína de choque térmico 65 (hsp65) y superóxido dismutasa A (sodA) en cepas de *N. brasiliensis* obtenidas de casos clínicos más dos

cepas de referencia han mostrado la existencia de tres genotipos bien definidos, donde el menor porcentaje de similitud encontrado fue de 97.97% y el mayor del 98.97% (12).

Otros genes que se han secuenciado para realizar la identificación a nivel especie de *Nocardia* son *gyrB*, *secA1* y *hsp65*, donde *gyrB* ha mostrado mejor potencial de discriminación. Es con este gen que se han encontrado diferencias entre cepas pertenecientes a *N. brasiliensis*, llevando a la creación de dos grupos que, además, muestran distintos patrones de presentación clínica, de susceptibilidad a imipenem y sustitución de G a T en la posición 160 del gen de ARNr 16S (32).

## **1.4 Métodos de restricción enzimática para la determinación de polimorfismos de DNA**

### 1.4.1 Generalidades

Los sistemas de restricción son técnicas moleculares que se basan en el análisis de la variabilidad de los fragmentos polimórficos de distintos genes, utilizando enzimas de restricción que identifican secuencias específicas de nucleótidos donde llevan a cabo una reacción de endonucleasa, separando el gen completo o parcial en un número variable de fragmentos que pueden ser visualizados, medidos y analizados al ser distribuidos en gel de agarosa por medio de electroforesis (33). El tamaño de estos segmentos es variable entre distintas especies, permitiendo así la discriminación precisa de las cepas de estudio, incluso aquellas con alto grado de similitud. Por sus características, esta técnica puede ser aplicada en bacterias, pero no en virus (34).

### 1.4.2 Ribotipificación

Los organismos procariotas contienen tres tipos de ARNr, el 16S, 23S y 5S, las secuencias de ADN que contienen la información para su codificación se hallan separadas por segmentos espaciadores no transcribibles. El gen 16S, al tener un tamaño de aproximadamente 1500 nucleótidos, es adecuado para la ribotipificación, donde las enzimas de restricción actúan sobre estos genes para obtener fragmentos de restricción y generar patrones conocidos como ribotipos (34) (35).

### 1.4.3 Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

La técnica de RFLP utiliza genes distintos a los ribosomales para su análisis por medio de enzimas de restricción, las cuales actúan al identificar secuencias específicas de nucleótidos y realizan cortes en estos, generando patrones de bandas para cada una de las secuencias estudiadas. Son especialmente utilizados los genes constitutivos como *hsp65* (proteína de choque térmico 65), *gyrB* (subunidad *gyrB* de la ADN girasa), *sodA* (superóxido dismutasa A), *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa), entre otros (22) (36).

#### 1.4.4 Enzimas de restricción

El número de bandas obtenidas y la efectividad de la técnica está sujeta a la elección que el laboratorio haga respecto a las enzimas de restricción para la cepa a estudiar (37) (33). Algunas enzimas de restricción que se han utilizado exitosamente en la secuenciación genética de especies bacterianas son *EcoRI*, *PstI*, *PvuII*, *BamHI*, *ClaI* y *HindIII* (33). Estudios han comparado la efectividad de *SmaI* y *SacII* al usarse en ribotipificación con PCR, hallando que *SacII* puede ser más discriminativa, recomendándose su uso (38).

#### 1.4.5 Comparación de los patrones de bandas

Las bandas obtenidas varían en cantidad y tamaño, siendo común hallar de 6 a 10 bandas con tamaño de 4.3 kb a 23 kb; 0 a 2 bandas con tamaño de 2 kb a 4 kb; y 1 a 5 bandas con tamaño menor a 2 kb. Es recomendable el uso de una cepa de referencia para comparar los resultados obtenidos. El análisis de los patrones de bandas puede ser realizado utilizando el algoritmo UPGMA (método de pares agrupados usando promedio aritmético). El poder de discriminación de la técnica, a su vez, puede ser medido en base a un índice de discriminación, el cual expresa la probabilidad de que dos cepas no relacionadas sean clasificadas en diferentes grupos (37). Se ha observado que la técnica manual de ribotipificación puede diferenciar mejor los fragmentos menores de 4 kbp, mientras que la técnica automatizada lo hace mejor con bandas mayores a 6 kbp (33).

#### 1.4.6 Ventajas de los métodos de restricción enzimática

Se ha descrito que los sistemas de restricción, como la ribotipificación en conjunto con PCR muestran una discriminación de 0.86 en la tipificación de bacterias, siendo éste un resultado satisfactorio (39). El alto poder de discriminación de estas técnicas, junto a su viable reproductibilidad, las hace eficaces y de gran utilidad para distinguir entre bacterias pertenecientes a diferentes especies e incluso puede ayudar a distinguir entre una cepa presente en un brote y una no relacionada (37).

#### 1.4.7 Estudios antecedentes

Se ha probado también su aplicación en conjunto con otros métodos, como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), con el cual se encontró una diferenciación considerablemente mayor de las cepas estudiadas (39). Comparándose con otros métodos, como Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), muestra concordancia con las clasificaciones realizadas a nivel especie. Se ha demostrado que existe poca variabilidad entre los fragmentos de



restricción que presenta cada especie, aumentando la confiabilidad que tiene este método para realizar discriminación entre cepas con alta similitud (38).

#### 1.4.8 Restricciones enzimáticas *in silico*

Los métodos de estudio de biología molecular se encuentran en constante desarrollo, sin embargo, los costos y las limitaciones de materiales, equipo e instalaciones necesarias para llevarlos a cabo han hecho necesaria la búsqueda de alternativas para su aplicación, teniendo entre éstas a los estudios por medio de softwares donde se realicen simulaciones altamente semejantes y exactas de estos procesos, también llamados estudios *in silico* (40).

Las restricciones enzimáticas, a su vez, han sido aplicadas de esta forma en múltiples ocasiones, siendo que actualmente se cuentan con diversos programas informáticos que permitan su realización (40).

#### 1.4.9 Validación de las restricciones enzimáticas *in silico* obtenidas en otros estudios

Son muchos los estudios publicados donde se ha demostrado la validez de las técnicas *in silico* de restricciones enzimáticas, aunque ninguna ha sido utilizada en cepas de *N. brasiliensis* hasta el momento; a continuación, se mencionan algunos resultados recientes del uso de RFLP por medio de softwares (40).

Debido a que las técnicas de restricción enzimática tienen una mayor capacidad de discriminación para lograr diferenciar cepas estrechamente relacionadas y que no pueden ser distinguidas por medio de la simple secuenciación de genes, como el ARNr 16s, Perez-López, E. y col. (41) realizaron un proyecto donde, por medio del software pDRAW32, se utilizaron 7 enzimas para la digestión de 19 secuencias del gen ARNr 16s obtenidas de fitoplasmas, encontrando 25 patrones distintos de restricción. El estudio se repitió *in vitro*, hallando correspondencia para 12 de las 19 secuencias en comparación con la restricción *in silico*, sin embargo, los tres grupos más importantes generados previamente fueron conservados.

En 2007, Rodriguez, J. y col. (42) reportaron los resultados de restricciones enzimáticas realizadas *in vitro* e *in silico*, comparando el tamaño y el número de los fragmentos generados, derivados de secuencias amplificadas del gen ARNr 16S de *R. rhodnii* y digeridos con las enzimas BamHI, HindIII, PstI y SacI. El resultado mostró que la concordancia entre ambos métodos fue del 100%. La restricción fue realizada por medio del programa TAGC de <http://workbench.edu.sdsc>.

Las restricciones enzimáticas *in silico* también son útiles para la discriminación y elección de enzimas adecuadas al realizar un determinado estudio *in vitro*, ayudando a identificar aquellas que realizan cortes en el gen requerido y después seleccionar, basándose en el número y tamaño de bandas generadas, las que sean de mayor utilidad. Aravena, P. y col. (43) realizaron restricciones con 650 diversas enzimas, disponibles en REBASE, en 76 secuencias del gen ARNr 16S de *P. salmonis* a través del software EMBOSS Suit versión 6.3.1. Con este proceso, pudieron detectar 7 enzimas de interés para su estudio, las cuales fueron utilizadas posteriormente para identificar los genotipos LF-89 y EM-90 de 13 cepas control y 57 muestras de *P. salmonis* aisladas de salmones.

Naveen Kumar y col. (44) realizaron RFLP *in silico* con el software pDRAW 32, donde utilizaron 12 enzimas distintas para realizar cortes en los genes de granulina de 18 granulovirus, obteniendo patrones específicos para cada uno de ellos. Además de identificar las enzimas de mayor utilidad, los investigadores establecieron un patrón de corte específico para el gen de la granulina de *Achaea janata*, obteniendo un alto poder de discriminación. Posteriormente, los resultados obtenidos *in silico* fueron corroborados por medio de hibridación Southern blot, PCR y RFLP *in vitro*, encontrando coincidencia en casi la totalidad de ellos.

El estudio realizado por Keramati, M. y col. (45) utilizó los programas Gene Runner ver. 3.05, Clone Manager versión 9 y MEGA versión 9 para realizar restricciones *in silico* con 30 enzimas distintas en 39 secuencias de la región variable SK $\beta$  de la estreptocinasa, producida por cepas de *estreptococos*. La finalidad era identificar aquellas enzimas que generaran los mejores patrones de restricción, basándose en el número y tamaño de bandas resultantes. Posteriormente, fueron realizadas las restricciones enzimáticas *in vitro*, utilizando 3 enzimas seleccionadas previamente y 40 muestras de la región variable SK $\beta$  de la estreptocinasa, obtenidas de casos clínicos. Los resultados, altamente similares a los obtenidos *in silico*, comprobaron la utilidad de las técnicas por medio de softwares.

## 2. Planteamiento del Problema

Las bacterias fueron concebidas por la mente humana hasta 1684, al ser observadas a través de un instrumento inespecífico de amplificación de imagen. En el siglo XIX se comenzó a indagar sobre su posible papel en las afecciones médicas, convirtiéndose así en el punto de partida de lo que contemporáneamente será la microbiología. Actualmente es bien conocido el papel protagónico que tienen las bacterias en innumerables enfermedades infecciosas, haciendo que su conocimiento continúe siendo preponderante en cualquier campo que tenga a la salud como objeto de estudio.

La identificación fiable de un microorganismo patógeno es fundamental por diversas razones, pues con base en ese conocimiento, es posible realizar una correcta clasificación taxonómica, proporcionar mayores conocimientos sobre la patología de interés, observar el comportamiento del agente en el desarrollo de la enfermedad, comprender las condiciones que llevan a la manifestación clínica de la afección, formular diagnósticos correctos y establecer un tratamiento adecuado, eficaz y específico, que lleve a la resolución de la enfermedad. La dificultad o imposibilidad de esta identificación puede llevar, en la práctica clínica, a diagnósticos especulativos y tratamientos erróneos; en el área epidemiológica, a la generación de estadísticas poco confiables y, en el área de la microbiología, a aceptación de conocimientos desactualizados.

De forma inicial, la mayoría de los laboratorios realizan caracterizaciones fenotípicas de los agentes patógenos, utilizando para ello cultivos, observación morfológica y pruebas bioquímicas y metabólicas tradicionales. Es un hecho, sin embargo, que estos instrumentos presentes en la mayoría de los laboratorios no son de utilidad en bacterias de difícil identificación. El desarrollo y posterior aplicación de técnicas de biología molecular en la medicina ha posibilitado el uso de pruebas de identificación genética en los microorganismos, cambiando el panorama anterior y volviendo los resultados obtenidos cada vez más específicos y fiables; de igual manera, el uso de herramientas informáticas o pruebas *in silico* ha facilitado la aplicación de estas técnicas, así como su reducción de recursos y costos, sin disminuir con ello su fiabilidad. El impacto ha sido tan notable que no sólo se han descrito especies nuevas en las últimas décadas, sino que también se han identificado las subespecies correspondientes.

Uno de los grupos de bacterias de difícil identificación son los Actinomicetos, microorganismos de relativa baja patogenicidad pero que al colonizar un huésped la expresión clínica se vuelve

severa e incluso fatal; especialmente el género *Nocardia*. La complejidad para su clasificación taxonómica tiene un trasfondo histórico conocido, donde al fallar los métodos comunes de clasificación fenotípica, se han debido hallar otros rasgos que permitan establecer puntos de corte para su ordenamiento como en el caso de la susceptibilidad antimicrobiana. Las técnicas moleculares, de modo esperado, significaron un cambio en la taxonomía de las especies pertenecientes al género *Nocardia*, logrando que actualmente se encuentren identificadas y aceptadas 119 especies.

Es importante señalar que, si bien el conjunto de pruebas fenotípicas y moleculares son de utilidad para lograr el conocimiento de las cepas estudiadas, en la actualidad no se han resuelto muchos de los problemas taxonómicos que envuelven a algunas especies e incluso géneros, tal como sucede con *N. brasiliensis*, una de las especies aisladas con más frecuencia en el actinomicetoma, patología crónica, progresiva e incapacitante que constituye un severo problema en naciones cercanas a los trópicos y, en especial, a las zonas donde los servicios en la vivienda no son adecuados.

Se ha encontrado que *N. brasiliensis*, primero, posee alta semejanza con *N. vulneris* y que dentro de la misma especie es posible hallar variaciones importantes y bien definidas que imposibilitan la homogenización de los perfiles bioquímicos, de susceptibilidad a antibióticos e incluso de las secuencias genéticas en este grupo. Lo anterior ha ampliado la interrogante sobre la taxonomía de la especie pues se desconoce actualmente si existen subespecies dentro de *N. brasiliensis* o grupos definidos por características topológicas, metabólicas, estructurales o genéticas.

El uso de métodos moleculares que permitan un análisis detallado en la estructura genómica, capaz de hallar semejanzas y diferencias entre cepas estudiadas, puede ser un medio para resolver algunas de estas problemáticas taxonómicas. La ribotipificación y el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), *in vitro* o *in silico*, en los que se realiza el análisis de los patrones de las regiones variables de distintos genes, son técnicas que cumplen con este objetivo.

Utilizar métodos moleculares con herramientas informáticas, no sólo para identificar exitosamente a *N. brasiliensis*, sino para observar, analizar y agrupar las diferencias presentes en las distintas cepas pertenecientes a la misma especie, puede llevar a la ampliación de los conocimientos que se tienen sobre estos actinomicetos, a la descripción minuciosa de subespecies o genotipos que puedan explicar su alta variabilidad y a su correcto reporte epidemiológico.

**Pregunta de investigación**

1. ¿Permitirán las técnicas de restricción enzimática *in silico* detectar variaciones genéticas en cepas de *Nocardia brasiliensis*?

### 3. Hipótesis

#### **Hipótesis alterna:**

1. Las técnicas de restricción enzimática *in silico* permiten detectar variaciones genéticas en cepas de *Nocardia brasiliensis*.

#### **Hipótesis nula:**

1. Las técnicas de restricción enzimática *in silico* no permiten detectar variaciones genéticas en cepas de *Nocardia brasiliensis*.

#### 4. Objetivos

##### **General:**

1. Detectar variaciones genéticas en cepas de *Nocardia brasiliensis* por medio de técnicas de restricción enzimática *in silico*.

##### **Específicos:**

1. Realizar la ribotipificación *in silico* en el gen ARNr16S.
2. Detectar las variaciones genéticas resultantes en las secuencias de ADN.
3. Establecer si las agrupaciones pueden ser definidas como genotipos de *Nocardia brasiliensis*.

## 5. Justificación

El actinomicetoma es un síndrome anatómico-clínico constituido por lesiones cutáneas fistuladas con drenaje seropurulento e inflamación crónica superficial o profunda que provoca deformidad de la zona afectada. Predomina en las regiones tropicales de África, Asia y Latinoamérica, siendo que en éste último se encuentra con mayor proporción en México, donde se estima que la prevalencia de la enfermedad es de 3, 796 casos, aunque es posible que esta cifra se encuentre subestimada al no contarse con una vigilancia epidemiológica estrecha. El pronóstico de los pacientes con actinomicetoma suele ser malo para la función, a causa de la limitación física secundaria a la deformidad de las lesiones al extenderse y malo para la vida cuando las lesiones han logrado diseminarse a tejido pulmonar o nervioso.

Los agentes causales de la patología son los actinomicetos de los géneros *Nocardia*, *Streptomyces*, *Actinomadura* y *Rhodococcus*; habiéndose evidenciado que *Nocardia brasiliensis* es la especie más común, causando el 65.58% de los actinomicetomas en México.

Desde la primera descripción del género *Nocardia*, en 1888, la identificación de sus especies ha sido difícil a causa de su alta semejanza fenotípica, siendo que para 1980 se tenían contempladas sólo 20 especies con base a sus características morfológicas, fisiológicas y de crecimiento. Actualmente, con la aplicación de técnicas de identificación molecular, se ha aceptado la existencia de 119 especies, sin embargo, un consenso taxonómico aún está lejos de establecerse. La misma ampliación en el conocimiento de las especies de *Nocardia* han llevado a identificar la existencia de variaciones en las características clínicas, perfiles bioquímicos y de susceptibilidad a antibióticos en cepas pertenecientes a la misma especie, dirigiendo la investigación a la búsqueda de subespecies o subgrupos definidos por características topológicas, metabólicas, estructurales o genéticas.

Algunos de los métodos moleculares con uso de sistemas de restricción como la ribotipificación y RFLP, identifican la variabilidad de los fragmentos polimórficos de determinados genes, posibilitando un análisis profundo y detallado del genoma bacteriano que, además de definir género y especie exitosamente, pueden puntualizar en la secuencia genética individual de cada cepa estudiada. Estas técnicas pueden ser utilizadas por medio de herramientas informáticas, haciendo así que el uso de recursos materiales y, por ende, los costos sean reducidos de forma significativa,



sin que ello signifique una disminución en la fiabilidad de los resultados, pues la semejanza entre los datos obtenidos *in silico* e *in vitro* es altamente significativa.

De este modo, utilizar las técnicas de ribotipificación o RFLP *in silico* en las cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de casos clínicos, puede ser útil para detectar las variaciones genéticas de la especie y, fundamentadas en las mismas, realizar la subclasificación en genotipos o subespecies.

## **6. Material y Métodos**

### **6.1. Diseño de Estudio**

Tipo de estudio

Transversal, descriptivo.

Universo

Colección de 191 cepas de actinomicetos aisladas de casos clínicos de actinomicetomas en humanos, donadas por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) y actualmente resguardadas en el Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina UAEMex.

Muestra

78 cepas identificadas por medio de secuenciación del gen ARNr 16s como *Nocardia brasiliensis*, aisladas de casos clínicos de actinomicetomas en humanos, donadas por el InDRE.

### **6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

Criterios de inclusión

Cepas identificadas como *Nocardia brasiliensis* aisladas de casos clínicos de actinomicetomas en humanos.

Criterios de exclusión

Cepas pertenecientes a otras especies distintas de *Nocardia brasiliensis*, así como cepas que pertenezcan a instituciones diferentes al InDRE.

Criterios de eliminación

Cepas que no pudieron ser reactivadas exitosamente o que murieron en el transcurso del proyecto.

### **6.3. Procedimientos**

Todos los procedimientos se realizaron con base en los lineamientos establecidos en el manual de Protocolos del Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la UAEMex, 2019.

### 6.3.1. Colección de cepas de *Nocardia* incluidas en el estudio

Se cuenta con una colección de 207 cepas de *Nocardia* aisladas de casos clínicos de actinomicetomas en humanos, que fueron recolectadas desde distintas instituciones de salud pública en América por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE) y donadas posteriormente al Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina UAEMex.

La localización de las lesiones de actinomicetoma de las que fueron aisladas incluyen miembro inferior, tórax, miembro superior, región dorsal, pulmón, cabeza y cuello.

La colección data de 1944 hasta 1999 y algunas de las micotecas de origen son las siguientes:

- 1) Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
- 2) Hospital General de México
- 3) Hospital General “Dr. Manuel Gea González”
- 4) Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”

### 6.3.2. Reactivación de las cepas

Las muestras originales de la colección de actinomicetos, donadas por el INDRE, se encontraban en conservación dentro de criotubos a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  y para su reactivación se realizaron siembras en los medios de cultivo sólidos, como son agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BD Bioxon™, número de catálogo 214700) y agar dextrosa Sabouraud (BD Bioxon™ número de catálogo 210700) con adición de papa deshidratada al 1%. Las concentraciones para los medios fueron las siguientes.

#### Agar dextrosa Sabouraud con papa al 1%

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Agar dextrosa Sabouraud | 65 g    |
| Papa deshidratada       | 10 g    |
| Agua destilada          | 1000 ml |

#### Agar BHI

|                |         |
|----------------|---------|
| Agar BHI       | 37 g    |
| Agua destilada | 1000 ml |

Para realizar la inoculación de las cepas, se utilizó la técnica de estría cruzada, posteriormente se incubaron a 37°C durante tres a seis semanas para su crecimiento.

La morfología de las colonias se observó directamente, inspeccionando el color, forma, textura, elevación e hifa aérea características de los actinomicetos. Posteriormente, se tomó una muestra de cada colonia para su tinción con técnica de Gram y su visualización al microscopio, donde se buscó la presencia de células filamentosas ramificadas Gram positivos, además de micelios microsifonados y fragmentados.

### 6.3.3. Obtención de biomasa para extracción de ADN

Las colonias puras fueron posteriormente inoculadas en medio líquido dextrosa Sabouraud (BD Bioxon™, número de catálogo 222400) e incubadas en agitación a 37°C por 30 días. Las concentraciones necesarias para el medio de cultivo se muestran a continuación.

| Caldo Sabouraud |         |
|-----------------|---------|
| Caldo Sabouraud | 30 mg   |
| Agua destilada  | 1000 ml |

Después del periodo de incubación, el contenido fue colocado en tubos cónicos estériles que se centrifugaron a 9,000 rpm durante 5 minutos para la obtención de biomasa. El sobrenadante fue desechado posteriormente y la biomasa obtenida fue colocada en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml con solución salina estéril, por medio de micropipeta; los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos y, nuevamente, se desechó el sobrenadante. El contenido resultante en los tubos fue utilizado para la extracción de ADN.

### 6.3.4. Extracción de ADN de las cepas

La extracción de ADN de las cepas se realizó con el Kit Promega Wizard® Genomic, que cuenta con las siguientes especificaciones:

Preparación de reactivos

## EDTA 0.05M aforado a 100 ml

|      |         |
|------|---------|
| EDTA | 18.61 g |
| Agua | 70 ml   |
| pH   | 8       |

## Lisozima

|   |       |
|---|-------|
| Lisozima                                | 20 mg |
| Agua estéril libre de nucleasas Milli Q | 1 ml  |

## RNAsa

|   |      |
|---|------|
| RNAsa liofilizada                       | 4 mg |
| Agua estéril libre de nucleasas Milli Q | 1 ml |

## Protocolo de extracción:

1. Resuspender el pellet de la biomasa con 480  $\mu$ l de EDTA 0.5 M
2. Añadir 120  $\mu$ l (10mg/ml) de lisozima al pellet resuspendido.
3. Incubar a 31°C durante una hora.
4. Centrifugar durante dos minutos a 14,000 rpm, remover el sobrenadante.
5. Adicionar 600  $\mu$ l de solución nuclear de lisis del paquete de purificación de ADN Promega Wizard® Genomic y mezclar cuidadosamente.
6. Incubar a 80°C durante 5 minutos, después dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Añadir 3  $\mu$ l de la solución RNAsa del paquete de purificación de ADN Promega Wizard® Genomic y mezclar el tubo por el método de inversión, tres veces.
8. Incubar a 37°C durante 1 hora el tubo obtenido y dejar enfriar a temperatura ambiente.
9. Añadir 200  $\mu$ l de la solución de precipitación de proteínas del paquete de purificación de ADN Promega Wizard® Genomic a la solución que se trabajó con la RNAsa, después agitar en vórtex vigorosamente durante 20 segundos para lograr su mezcla.
10. Incubar a -20°C durante 5 minutos.
11. Centrifugar a 14,000 rpm durante 3 minutos, transferir el sobrenadante al tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril con 600  $\mu$ l de isopropanol añadido.

12. Mezclar suavemente hasta observar la formación de hebras de ADN.
13. Centrifugar la mezcla a 14,000 rpm durante 2 minutos.
14. Drenar cuidadosamente el tubo de la mezcla en papel absorbente, añadir 600  $\mu$ l de etanol al 70%, invertir el tubo en repetidas ocasiones suavemente para realizar el lavado del pellet de ADN.
15. Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 minutos.
16. Eliminar el etanol con cuidado, dejar secar el tubo durante 10-15 minutos.
17. Añadir 100  $\mu$ l de solución de rehidratación del paquete de purificación de ADN Promega Wizard® Genomic y pasar a incubación a 4°C en refrigerador.

Una vez que se obtuvo el material genético, éste fue separado en cinco alícuotas con un contenido de 20  $\mu$ l cada una y conservadas en congelador a -20°C.

#### 6.3.5. Visualización de ADN por electroforesis

Para determinar la presencia del material genético, así como su integridad, se realizó una electroforesis en gel de agarosa bajo las siguientes especificaciones.

| Reactivos         | Cámara<br>chica | Cámara<br>mediana | Cámara<br>grande |
|-------------------|-----------------|-------------------|------------------|
| Agarosa           | 0.25 g          | 0.50 g            | 0.75 g           |
| Buffer TAE 1X     | 25 ml           | 50 ml             | 75 ml            |
| Bromuro de etidio | 3 $\mu$ l       | 5 $\mu$ l         | 7 $\mu$ l        |

La técnica para la preparación del gel de agarosa y la visualización del ADN fue la siguiente.

Preparar un gel de agarosa al 1%

1. Colocar la agarosa (Conda Pronadisa, número de catálogo 8100.10) y el buffer TAE 1X (TAE buffer 1X Invitrogen, número de catálogo 24710-030) en un matraz de 200ml.
2. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla de agarosa y buffer.
3. Calentar cuidadosamente y mezclar agitando el matraz hasta que se disuelvan los sólidos y la mezcla se observe totalmente transparente.
4. Añadir el bromuro de etidio (SIGMA, número de catálogo E7637-1G) y homogeneizar la mezcla

5. Verter la agarosa sobre la cámara de electroforesis del tamaño adecuado.
6. Dejar solidificar la agarosa.
7. En un trozo de parafilm, colocar 3  $\mu$ l de buffer de carga para cada muestra.
8. Tomar 3  $\mu$ l de ADN y mezclar con el buffer de carga sobre el parafilm.
9. Colocar la mezcla en los pozos cuidadosamente.
10. Colocar 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular de 1kb (300-10,000 bp, Trading New Technologies No. de catálogo Axygen M-ADN-1Kb).
11. Cerrar la cámara de electroforesis y programar a 120 Volts y 300 mA por 40 min.
12. Transferir el gel al fotodocumentador.
13. Finalmente se capturará la imagen y se guardará el archivo.

#### 6.3.5 Dilución del ADN

Las muestras de ADN que manifestaron bandas marcadas en la electroforesis por alta concentración de nucleótidos fueron diluidas en agua desionizada libre de nucleasas con relación 1:10, 1:100 o 1:1000, según sea el caso.

#### 6.3.6 Amplificación del gen ARNr 23S por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

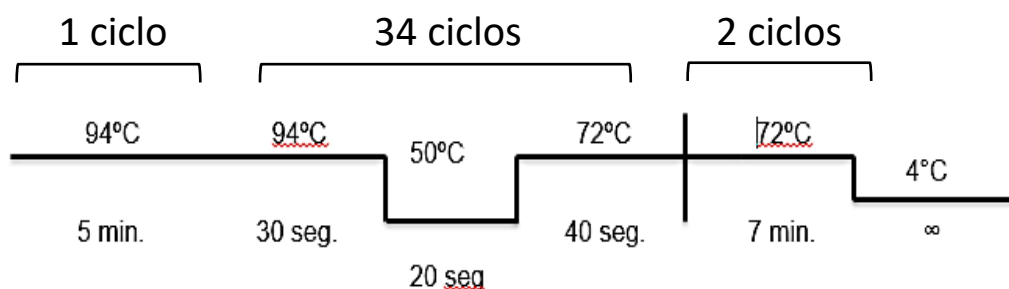
Previamente a la identificación con gen ARNr 16S, se realizó una amplificación del ARNr 23S como prueba de pureza, auxiliando a detectar y descartar contaminación de las cepas de estudio con cualquier otra eubacteria.

Para la comprobación de pureza y para descartar contaminación con eubacterias, previamente a la identificación con el gen ARNr 16S, se realizó una amplificación del inserto del gen ARNr 23S, debido a que, en este procedimiento, la banda generada y observada tiene un tamaño de 250 pb en el caso de las eubacterias y de 350 pb en el caso de las actinobacterias, siendo una buena herramienta para la diferenciación de ambas.

El procedimiento y cálculo para las reacciones de PCR del gen ARNr 23S se realizó de la siguiente forma.

1. Adicionar 3ml de ADN (muestra a amplificar) en un tubo para microcentrífuga para PCR (200 $\mu$ l) y reservar.
2. Preparar la mezcla maestra.

3. Colocar la mezcla maestra 10 segundos en el vortex para asegurar su homogeneidad.
4. Colocar 22µl de esta mezcla a cada uno de los tubos con el ADN.
5. Mezclar en vortex los tubos con ADN y mezcla de PCR durante 10 segundos.
6. Centrifugar los tubos colocando previamente las camisas para evitar que los tubos de 200ml se rompan.
7. Colocar los tubos dentro del termociclador.
8. Seleccionar el programa correspondiente a 23S, y oprimir el botón de corrida (RUN).
9. La programación de los ciclos de PCR para 23S presenta un ciclo de 5 minutos bajo 94°C, 34 ciclos con cambios de 30 segundos bajo 94°C, 20 segundos a 50°C y 40 segundos bajo 72°C, posteriormente son dos ciclos de 7 minutos bajo 72°C y por tiempo indefinido sometido a enfriamiento en 4°C. Se ilustra en la figura a continuación.



**Figura 3.** Programación para PCR 23S

10. Visualizar los productos de PCR de 23S en una electroforesis en gel de agarosa al 2% colocando los 25µl del amplicon, 5µl de buffer de carga y marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Scientific, número de catálogo 15628019). Se correrá la electroforesis a 120V, 300mA, 50W, durante 40 minutos.
11. Para realizar la interpretación del resultado de la PCR 23S, se toma en cuenta que las eubacterias generan una banda de 250pb, mientras que la banda de las actinobacterias es de 350pb; así, se espera que las cepas estudiadas cumplan con este último criterio.



Volumen total de reacción: 25µl

| Reactivos        | Concentración final del reactivo | Cantidad de reactivo |
|------------------|----------------------------------|----------------------|
| H <sub>2</sub> O | -                                | 14.5µl               |
| Buffer PCR (10x) | 1.00                             | 5.00µl               |
| Taq 5U/ml        | 1.00                             | 0.5µl                |
| Primer (F) 10mM  | 1.00                             | 1.00µl               |
| Primer (R) 10mM  | 1.00                             | 1.00µl               |
| ADN              |                                  | 3µl                  |

### 6.3.7 Amplificación del gen ARNr 16S

Una vez obtenido el material genético de las cepas de estudio y realizada la prueba de pureza, se llevó a cabo la identificación molecular de cada uno de los actinomicetos, para ello se obtuvo la amplificación del gen ARNr 16S por medio de PCR, utilizándose los siguientes *primers* o cebadores universales (46):

27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Los productos de la PCR fueron visualizados en una electroforesis en gel de agarosa. Las especificaciones para la preparación de la PCR y el protocolo de amplificación utilizando Taq<sup>TM</sup> ADN polimerasa de Bioline (My taq, Bioline) se mencionan a continuación.

Cálculo para las reacciones de PCR para amplificación del gen ARNr 16S

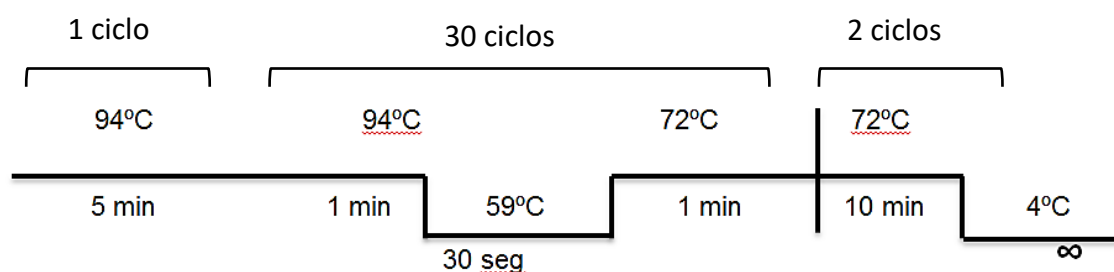
|         |  |
|---------|--|
| 14.7 µl | H <sub>2</sub> O libre de nucleasas    |
| 2.50 µl | Buffer PCR (10x)                       |
| 2.50 µl | Primer (F) 10mM                        |
| 2.50 µl | Primer (R) 10mM                        |
| 0.20 µl | Taq <sup>TM</sup> ADN polimerasa 5U/ml |
| 3 ml    | ADN                                    |

### Preparación de mezcla maestra

- a) Añadir 3 ml del ADN extraído en un tubo de 200µl de microcentrífuga para PCR y reservar
- b) En un tubo de 1.5ml, añadir el H<sub>2</sub>O libre de nucleasas
- c) Descongelar y homogeneizar el buffer de PCR previamente a ser añadido
- d) Descongelar y homogeneizar cada uno de los *primers* previamente a ser añadidos
- e) Añadir Taq™ ADN polimerasa (My taq, Bioline)
- f) Homogeneizar la mezcla en vórtex por 10 segundos
- g) Adicionar 22 µl de la mezcla maestra a cada tubo con el ADN
- h) Colocar en el vórtex los tubos con ADN y mezcla de PCR durante 10 segundos
- i) Centrifugar los tubos y precipitar el contenido

### Protocolo de amplificación con PCR

1. Ingresar los tubos con ADN y mezcla de PCR al termociclador MaxyGenII (Axygen®).
2. Seleccionar el programa correspondiente a ARNr 16S, formado por un ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos con tres estadios de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 59°C y 1 minuto a 72°C, posteriormente ocurre un ciclo de 10 minutos a 72°C y un enfriamiento a 4°C por tiempo indefinido. El programa se ilustra a continuación.



**Figura 4.** Programación para PCR 16S

3. Los productos son observados en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, al correrse a 120V, 300mA, 50W durante 30 minutos. El gel se transfiere al foto-documentador y la imagen es capturada y digitalizada.

Preparación de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (Conda Pronadisa, número de catálogo 8100.10).

|        |  |
|--------|--|
| 200 ml | Buffer TAE 1X (TAE buffer 1X Invitrogen, número de catálogo 24710-030)           |
| 2µl    | Amplicón   |
| 2µl    | Buffer de carga  |
| 5 µl   | Marcador de peso molecular de 1Kb (Thermo scientific, número de catálogo 5M0311) |

Posteriormente, los fragmentos amplificados fueron enviados al servicio de secuenciación Macrogen en Maryland, Estados Unidos.

#### 6.3.8 Corrección de las secuencias genéticas obtenidas a partir de ARNr 16S

La corrección de las secuencias fue realizada por medio del programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.0. (47).

#### 6.3.9 Identificación molecular de cepas por medio del gen ARNr 16S

Una vez que se obtuvieron las secuencias corregidas, fueron comparadas en busca de porcentajes de semejanza con cepas tipo halladas en las bases de datos BLAST (48) y EzBioCloud (49), tomándose como resultado aquellas que poseían un porcentaje igual o mayor al 98%.

#### 6.3.10 RFLP *in silico*

Para la realización de las restricciones enzimáticas *in silico*, fue utilizada la herramienta virtual de New England BioLabs® NEBcutter (50), con la cual se probaron las 39 enzimas comerciales disponibles en la plataforma y, con base en los resultados, se eligieron aquellas a utilizar.

Las enzimas elegidas fueron consideradas según el número y tamaño de cortes, así como la superposición de los sitios de restricción en caso de ser más de una enzima. De este modo, se optó por utilizar *NspI* y *SfcI*, cuyas secuencias de reconocimiento se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Enzimas de restricción útiles para el gen ARNr 16S en *N. brasiliensis*

| Enzima      | Secuencia de reconocimiento |
|-------------|-----------------------------|
| <i>NspI</i> | RCATGY                      |
| <i>SfcI</i> | CTRYAG                      |

Una vez elegidas las enzimas, se realizó la restricción *in silico* de cada una de las secuencias de las 78 cepas de *N. brasiliensis* obtenidas de casos clínicos, más 2 cepas tipo obtenidas de GenBank, así como 8 cepas de otras especies de *Nocardia* que fungieron como controles.

#### 6.3.11 Interpretación de los patrones de restricción

Cuando todos los patrones de restricción fueron obtenidos, se agruparon de acuerdo con el número y tamaño de las bandas generadas. Dentro de los criterios usados, se estimó que todas las cepas integrantes de cada grupo presentaran el mismo número de bandas y que la diferencia en el tamaño de cada uno de los fragmentos no fuese mayor a 14 nucleótidos.

Para realizar una comparación visual de las cepas pertenecientes a cada grupo, se generaron electroforesis virtuales, con las cuales se pudo apreciar la semejanza en cuanto a la distribución de cada una de las bandas y, al mismo tiempo, las diferencias entre los integrantes de distintos grupos.

## 6.4 Variables de Estudio

Independientes

Cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de casos clínicos.

## Dependientes

Patrones de restricción de las cepas de *Nocardia brasiliensis* obtenidos por medio del análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica *in silico* del gen ARNr 16S.

## Intervinientes

Mutaciones en el material genético de las cepas de *N. brasiliensis*.

Contaminación de las colonias bacterianas.

| Variable   | Definición conceptual  | Definición operativa  | Tipo de variable | Escala de medición | Análisis Estadísticos                 |
|--|--|---|------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Bacterias de la especie <i>Nocardia brasiliensis</i>   | Bacterias Gram positivo pertenecientes a la especie <i>Nocardia brasiliensis</i> , del género <i>Nocardia</i> , orden <i>Actinomycetales</i> y clase <i>Actinobacteria</i> .   | Cepas identificadas previamente como <i>Nocardia brasiliensis</i> , aisladas de casos clínicos de actinomicetomas en humanos, donadas por el InDRE.   | Cualitativa      | Nominal            | Tablas de distribución de frecuencias |
| Patrones de restricción de las cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> obtenidos por medio del análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica del gen ARNr 16S <i>in silico</i> . | Fragmento de ADN que posee una secuencia de nucleótidos, con un número variable de pares de bases, reconocida por una enzima de restricción a partir de 4 a 8 pares de bases, que generará un corte en la cadena de ADN. Realizado por medio de programas bioinformáticos validados. | Fragmentos del gen ARNr 16S perteneciente a las cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> aisladas de casos clínicos, reconocidos por las enzimas de restricción <i>NspI</i> y <i>SfcI</i> <i>in silico</i> . | Cualitativa      | Ordinal            | Tablas de distribución de frecuencias |

## **6.5 Implicaciones Bioéticas**

Los procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos de seguridad según el manual del laboratorio de investigación en Microbiología Médica y Ambiental por tratarse de manejo de microorganismos patógenos, según establece la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de 2007.

El proyecto de investigación se realizó según dictan las metas y objetivos de la línea de investigación en Ciencias De La Salud, como lo establece el Reglamento de la Investigación Universitaria de la Universidad Autónoma del Estado de México; determinando la creación, aplicación y difusión de conocimientos sobre los problemas de salud y búsqueda de las respuestas que los avances científicos y tecnológicos abordan, todo dentro del área de la salud en un marco ético, humanístico y con calidad.

La investigación se llevó a cabo de acuerdo con las directrices éticas del Comité de Ética de la Investigación de la UAEMex, que decretan que el diseño del estudio debe realizarse con metodología minuciosa y uso correcto de técnicas necesarias para su aplicación, utilizando herramientas de análisis fehacientes, exponiendo siempre resultados honestos, creíbles y reproducibles. Se deben respetar, en todo momento, los preceptos de beneficencia y no maleficencia, con el objetivo de beneficiar la salud y la vida del ser humano, aclarando los posibles riesgos a los que se está expuesto en el desarrollo de la investigación, así como sus resoluciones.

El protocolo de investigación, además, fue sometido a la evaluación del Comité de Ética de la Investigación de la UAEMex.

## **6.6 Recolección de datos**

### **6.6.1 Identificación molecular de cepas de *N. brasiliensis***

Una vez obtenidas las secuencias corregidas de los genes ARNr 16S de las cepas de estudio, éstas fueron procesadas por medio de las herramientas de las bases de datos de BLAST (48) y EzBioCloud (49), las cuales muestran los porcentajes de similitud y de cobertura con las cepas tipo y otras secuencias aprobadas en las mismas plataformas en línea.

Por este medio, los datos fueron recopilados en software de hojas de cálculo, donde se generó el concentrado de información correspondiente.

### 6.6.2 Obtención de los patrones de restricción de cepas de *N. brasiliensis*

Se hizo uso de la herramienta virtual de New England BioLabs® NEBcutter (50), la cual posibilita la restricción enzimática *in silico* de las secuencias de nucleótidos ingresadas, generando así un patrón de sitios de corte y longitud de bandas, así como un modelo virtual individual de electroforesis.

Los datos correspondientes a la longitud y número de cortes de cada una de las cepas fueron registrados en software de hojas de cálculo, generando la base de datos correspondiente.

## 6.7 Análisis Estadísticos

Para la interpretación de la identificación molecular de las cepas de *N. brasiliensis*, se realizaron tablas de frecuencias de los resultados obtenidos en las bases de datos de BLAST (48) y EzBioCloud (49), incluyendo el porcentaje de similitud y el porcentaje de cobertura proporcionados por estas herramientas.

Para la interpretación de los patrones de restricción de las cepas de *N. brasiliensis*, se realizaron tablas de frecuencias de los resultados obtenidos en la herramienta virtual de New England BioLabs® NEBcutter (50), incluyendo el número y longitud de fragmentos generados por acción de las enzimas de restricción *NspI* y *SfcI* en el gen ARNr 16s de las cepas.



## 7. Referencias bibliográficas

1. Bonifaz A. Micología Médica básica. Quinta ed.: Mc Graw Hill; 2015.
2. Chavan Dilip V, Mulaje SS, Mohalkar RY. A Review on Actinomycetes and their Biotechnological Application. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2013; 4(5): p. 1730-1742.
3. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. Quinta ed.: Mc Graw Hill; 2014.
4. Quiñones Aguilar EE, Evangelista Martínez Z, Rincón Enríquez G. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Zahaed Evangelista-Martínez, Gabriel Rincón-Enríquez. Elementos Número 101, Volumen 23, 2016, pp. 59-64 ISSN 0187-9073. Elementos. 2016; 23(101): p. 59-64.
5. Parte AC. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018; 68: p. 1825-1829.
6. Reyes Tena A, Rincón Enríquez G, Evangelista Martínez Z, Quiñones Aguilar E, López Pérez L. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. Revista digital universitaria. 2015; 16(11).
7. de la Paz Bermúdez T, Portela Ramírez D, Jiménez Pérez NA, Dorvigny Scull MdC, Kitchin Wilson MA, Capó de Paz V. Neumonía por *Rhodococcus equi*: hallazgos clínico-radiológicos en ocho pacientes con sida. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2010; 62(3): p. 207-211.
8. Majidzadeh M, Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2018; 37(11): p. 2045-2062.
9. López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, et al. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. Gaceta Médica de México. 2013; 149(5): p. 586-592.
10. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. Mayo Clinic Proceedings. 2012; 87(4): p. 403-407.
11. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. Journal of Clinical Microbiology January. 2018; 56(1): p. e01419-17.

12. Kosova-Maali D, Bergeron E, Maali Y, Durand T, Gonzalez J, Mouni e D, et al. High Intraspecific Genetic Diversity of *Nocardia brasiliensis*, a Pathogen Responsible for Cutaneous Nocardiosis Found in France: Phylogenetic Relationships by Using *sod* and *hsp65* Genes. *BioMed Research International*. 2018 May; 2018: p. 7314054.
13. Montes de Oca Arjona M, Monsalvo Hernando M, Rodriguez Fernandez-Viagas C, González Fernández P. Nocardiosis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2018; 12(53): p. 3142-3152.
14. Guzzi Maqueda , Malieni DF, Torre AC, Galimberti R. Nocardiosis cut nea y sus formas clínicas. *Dermatolog a Argentina*. 2010; 16(3): p. 195-198.
15. Kuchibiro T, Ikeda T, Nakanishi H, Morishita Y, Houdai K, Ito J, et al. First case report of pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia mexicana*. *JMM Case Reports*. 2016; 3(4): p. e005054.
16. Wallace RJ, Steele LC, Sumter G, Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32: p. 1776-1779.
17. McNaab A, Shuttleworth R, Behme R, Colby WD. Fatty Acid Characterization of Rapidly Growing Pathogenic Aerobic Actinomycetes as a Means of Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(6): p. 1361-1368.
18. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto A, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29(8): p. 601-608.
19. Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*. 2006; 33: p. 152–155.
20. Rudramurthy SM, Honnavar P, Kaur H, Samanta P, Ray P, Ghosh A, et al. Molecular identification of clinical *Nocardia* isolates from India. *Journal of Medical Microbiology*. 2015; 64: p. 1216-1225.
21. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *Journal of Medical Microbiology*. 2010; 59: p. 165-171.
22. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *Journal Of Clinical Microbiology*. 2010;: p. 4525-4533.

23. Gordon RE, Mihm JM. A Comparison of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. Journal of general microbiology. 1959; 20(1): p. 129–135.
24. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved Lists of Bacterial Names. International Journal of Systematic Bacteriology. 1980; 30: p. 225-420.
25. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia spp.* based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev. 2006; 19: p. 259-282.
26. Lindenberg A. Un nouveau mycetome. Archives de Parasitologie. 1909; 13: p. 265-282.
27. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Research. 2009 Jan; 37(Database issue): p. D5-D16.
28. Vera-Cabrera L, Ortiz-Lopez R, Elizondo-Gonzalez R, Ocampo-Candiani J. Complete genome sequence analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 reveals a saprobic lifestyle and the genes needed for human pathogenesis. PLoS One. 2013; 8(6): p. e65425.
29. Schlaberg R, Fisher MA, Hanson KE. Susceptibility profiles of *Nocardia* isolates based on current taxonomy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58(2): p. 795-800.
30. Lasker BA, Bell M, Klenk HP, Spröer C, Schumann P, Brown JM. *Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. Antonie van Leeuwenhoek. 2014 Julio; 106(3): p. 543–553.
31. Kageyama A, Hoshino Y, Watanabe M, Yazawa K, Mikami Y. Clinical isolates of *Nocardia brasiliensis* from Japan exhibit variable susceptibility to the antibiotic imipenem. Mycopathologia. 2004; 158(3): p. 275-278.
32. Chen KW, Lu CW, Huang TC, Lu CF, Liao YL, Lin JF, et al. Cutaneous manifestations of *Nocardia brasiliensis* infection in Taiwan during 2002–2012—clinical studies and molecular typing of pathogen by *gyrB* and 16S gene sequencing. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2013; 77(1): p. 74-78.
33. Schumann P, Pukall R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. Systematic and Applied Microbiology. 2013; 36(6): p. 369-375.
34. de Vries MC, Siezen RJ, Wijman JG, Zhao Y, Kleerebezem M, de Vos WM, et al. Comparative and functional analysis of the rRNA-operons and their tRNA gene complement

- in different lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 2006; 29(5): p. 358-367.
35. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, et al. Conducting a microbiome study. *Cell*. 2014; 158(2): p. 250-262.
36. Matloob M, Griffiths M. Ribotyping and Automated Ribotyping of *Listeria monocytogenes*. Humana Press. 2014; 1157: p. 85-93.
37. Ahmad S, Abulhamd A. Phenotypic and molecular characterization of nosocomial *K. pneumoniae* isolates by ribotyping. *Advances in Medical Sciences*. 2015; 60: p. 69-75.
38. Janezic S, Indra A, Allerberger F, Rupnik M. Use of different molecular typing methods for the study of heterogeneity within *Clostridium difficile* toxinotypes V and III. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60: p. 1101-1107.
39. Green LM, Worthington T, Hilton AC, Lambert PA. Genetic characterization of clinical isolates of *Clostridium difficile* using an optimized RAPD protocol and PCR ribotyping reveals strain diversity between two tertiary referral Trusts in the West Midlands, UK. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60: p. 1287-1291.
40. Vendrami DLJ, Forcada J, Hoffman JI. Experimental validation of in silico predicted RAD locus frequencies using genomic resources and short read data from a model marine mammal. *BMC Genomics*. 2019 Enero; 20(72).
41. Perez-Lopez E, Olivier CY, Luna-Rodriguez M, Dumonceaux TJ. Phytoplasma classification and phylogeny based on in silico and in vitro RFLP analysis of cpn60 universal target sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016 Diciembre; 66(12).
42. Rodriguez J, Pavia P, Calderon C, Montilla M, Nicholls R, Puerta CJ. Estandarización de una prueba de PCR-RFLP para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* en insectos triatominos. *Universitas Scientiarum*. 2007 Julio-Diciembre; 12(edición especial III): p. 11-22.
43. Aravena P, Pulgar R, Ortiz-Severin J, Maza F, Gaete A, Martínez S, et al. PCR-RFLP Detection and Genogroup Identification of *Piscirickettsia salmonis* in Field Samples. *Pathogens*. 2020 Mayo; 9(5): p. 358.
44. Kumar PN, Prasad YG, Prabhakar M, Shanker AK, Bhanu D. Molecular and in Silico Characterization of *Achaea janata* Granulovirus Granulin Gene. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 2017 Diciembre; 9(4): p. 528-539.

45. Keramati M, Aslani MM, Roohvand F. In silico design and in vitro validation of a novel PCR-RFLP assay for determination of phylogenetic clusters of streptokinase gene alleles in streptococci groups. *Microbial Pathogenesis*. 2020 Febrero; 139(103862): p. ISSN 0882-4010.
46. Lane DJ, Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. *Modern Microbiological Methods*. Modern Microbiological Methods. 1991;; p. 479-548.
47. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999; 41: p. 95-98.
48. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct; 215(3): p. 403-410.
49. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 May; 67(5): p. 1613-1617.
50. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003 Julio; 31(13): p. 3688–3691.

## 8. Anexos

### 8.1. Carta de envío del artículo

10/11/21 14:24

ScholarOne Manuscripts



The Journal of General and Applied Microbiology

[Home](#)[Author](#)

# Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

**Submitted to**

The Journal of General and Applied Microbiology

**Manuscript ID**

JGAM-2021-0199-FP

**Title**Detection of genetic variability in *Nocardia brasiliensis* strains isolated from clinical cases by in silico enzymatic restriction technique**Authors**

Cruz-Medrano, Michele Guadalupe

Manzanares-Leal, Gaudy Lizeth

González-Nava, Janette Berenice

Moreno-Pérez, Pablo Antonio

Sandoval-Trujillo, Horacio

Ramírez-Durán, Ninfa

**Date Submitted**

11-Nov-2021

10/11/21 14:24

ScholarOne Manuscripts

Author Dashboard

---

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2021. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)



**Detection of genetic variability in *Nocardia brasiliensis* strains isolated from clinical cases by in silico enzymatic restriction technique**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Journal:                       | <i>The Journal of General and Applied Microbiology</i>  |
| Manuscript ID                  | Draft   |
| Manuscript Type:               | Full Paper  |
| Date Submitted by the Author:  | n/a   |
| Complete List of Authors:      | Cruz-Medrano, Michele Guadalupe; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Facultad de Medicina<br>Manzanares-Leal, Gaudy Lizeth; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Facultad de Medicina<br>González-Nava, Janette Berenice ; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina<br>Moreno-Pérez, Pablo Antonio ; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina<br>Sandoval-Trujillo, Horacio; Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, Departamento de sistemas biológicos<br>Ramírez-Durán, Ninfa; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina |
| Keywords (Alphabetical Order): | Enzymatic restriction, genetic variability, in silico enzymatic restriction technique, <i>Nocardia brasiliensis</i> , ribotyping  |
| Category:                      | Molecular Genetics, Evolution and Phylogenetics   |
|                                |   |

SCHOLARONE™  
Manuscripts



## 8.2. Resumen del artículo

### Summary

*Nocardia brasiliensis* is the most important causal agent of actinomycetoma. In Mexico, it is responsible for up to 78.2% of cases. Taxonomic problems have been reported when identifying the species, so this study aimed to detect 16S rRNA gene variations in *N. brasiliensis* strains using an *in silico* enzymatic restriction technique. The study included strains from clinical cases of actinomycetoma, isolated from humans and previously identified as *N. brasiliensis* by traditional methods. The strains were characterized microscopically and macroscopically, then subjected to DNA extraction and amplification of the 16S rRNA gene by PCR. The amplification products were sequenced, and consensus sequences were constructed and used for genetic identification and *in silico* restriction enzyme analysis with the New England BioLabs® NEBcutter program. All study strains were molecularly identified as *Nocardia brasiliensis*; however, *in silico* restriction analysis detected diversity in the restriction patterns that were finally grouped into 7 ribotypes. This finding suggests the existence of subgroups within *N. brasiliensis*. The results obtained support the need to consider that *Nocardia brasiliensis* is a species complex.