

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



"DISTRIBUCION DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATOGENOS"

Por

Q.B.P. FRANCISCO LEOBARDO RESENDIZ URESTI

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Microbiología Médica

Noviembre, 2001

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

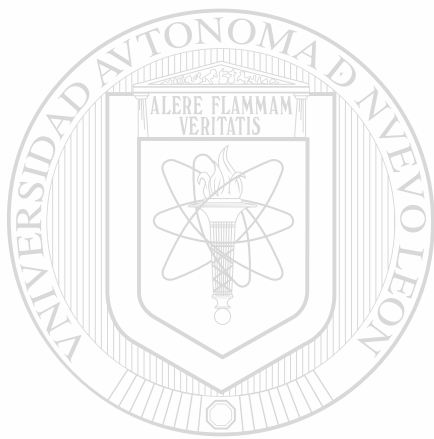
9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1

9 7 8 7 6 5 4 3 2 1



# UANL

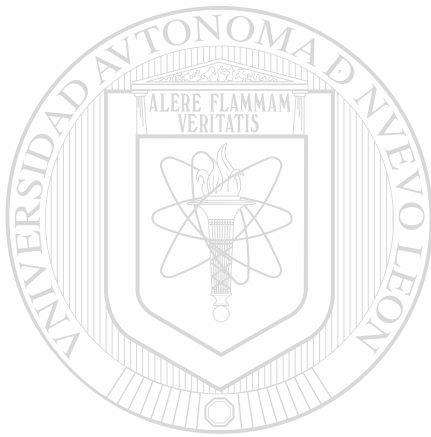
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Q R 82  
135  
R4  
c.1



# UANL

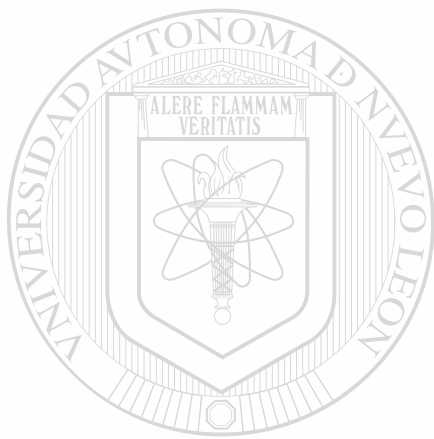
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





# UANL

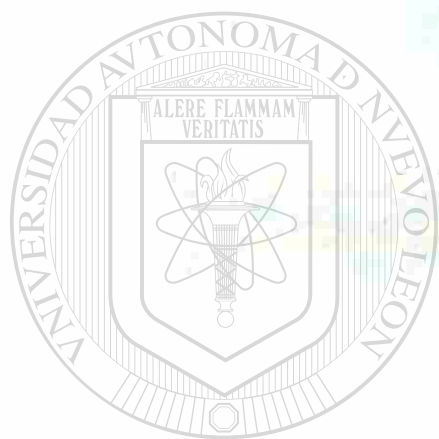
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
CARR. ITZAMPA 10000, SAN NICOLÁS DE LOS RÍOS, NUEVO LEÓN, MÉXICO  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Comunicación oficial por el Consejo de  
Médicos y Cirujanos de la Federación Mexicana  
Microbiología y Higiene

Noviembre, 2001

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**" DISTRIBUCION DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS "**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

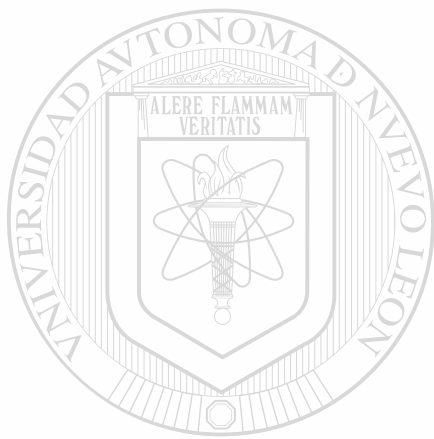
**Por**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Q.B.P. FRANCISCO LEOBARDO RESÉNDIZ URESTI**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS** con Especialidad en  
**Microbiología Médica**

**Noviembre, 2001**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

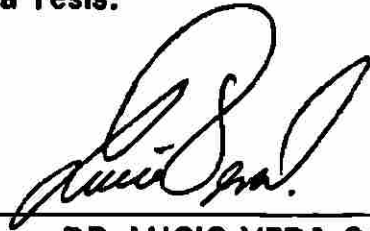
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





**DISTRIBUCION DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATOGENOS**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. LUCIO VERA CABRERA**  
Presidente y Director de Tesis



---

**DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ**  
Secretario



---

**DR. OLIVERIO WELSH LOZANO**  
1er. Vocal y Co-Director de Tesis



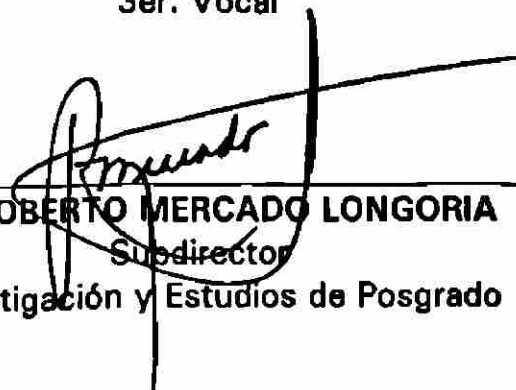
---

**DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA**  
2do. Vocal y Co-Director de Tesis



---

**M.C. GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ**  
3er. Vocal

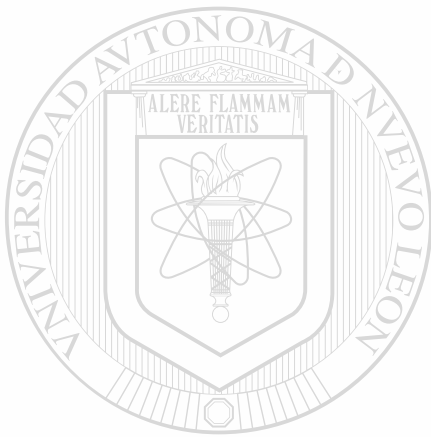


---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

## AREA DE TRABAJO

**El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID), perteneciente al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González", bajo la asesoría del Dr. Lucio Vera Cabrera y la co-asesoría del Dr. Oliverio Welsh Lozano y del Dr. Mario César Salinas Carmona.**



# UANL

---

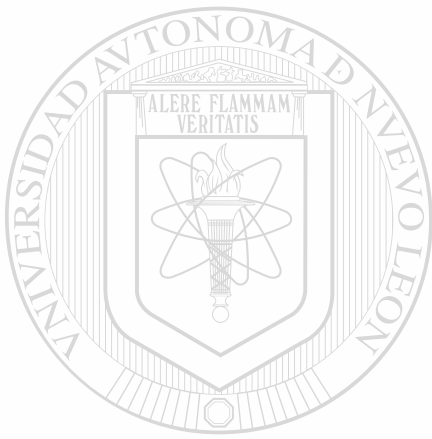
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## DEDICATORIA

Este trabajo que me ha costado tanto sacrificio terminarlo va dedicado especialmente para la persona que ha compartido tantos años de mi vida pasando alegrías, tristezas, problemas, logros, etc, pero que a pesar de todo hemos seguido adelante. Para mi esposa, Angelica María. Te amo.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **AGRADECIMIENTOS**

A los profesores del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina por sus enseñanzas y así como por sus consejos para salir adelante en la Maestría.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología, Julio, Perla, Agustina, Lupita y Conchis por su amistad.

A los profesores de los demás Departamentos por su esmero en transmitir sus conocimientos.

Al Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla (†) por aceptarme en el Depto. de Microbiología así como por su carismática manera de transmitir su sabiduría.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera por su enorme paciencia y por sus sabios consejos para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Oliverio Welsh Lozano por permitirme laborar en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, perteneciente al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”.

A la Comisión de Tesis por su interminable y laboriosa tarea de revisión del escrito para mejorar su contenido.

A Adriana Pizaña, Wendy Escalante, Concepción Melgoza y Lucio Vera por su amistad incondicional y por haberme soportado por tantos años.

A mis padres, que siempre me han brindado apoyo para continuar mis estudios a pesar de las adversidades.

A mis hermanos Aurora, José Antonio, Mario Felipe, María del Pilar y San Juana por toda una vida de compartir triunfos y fracasos .

Al CONACYT, por haberme apoyado económicamente para la realización de esta tesis.

A Dios, gracias...



## RESUMEN

Francisco Leobardo Reséndiz Uresti  
 Universidad Autónoma de Nuevo León  
 Facultad de Medicina

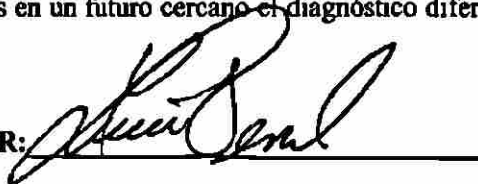
Fecha de Graduación: Noviembre del 2001

**Título de Tesis:** DISTRIBUCIÓN DEL FRAGMENTO *katN* DE *Nocardia brasiliensis* EN ESPECIES DE ACTINOMICETOS PATÓGENOS.  
**Número de páginas:** 85  
 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica.  
**Area de Estudio:** Microbiología Médica.

**Propósito y Método de Estudio.** El micetoma es una enfermedad subcutánea crónica, localizada, y de progresión lenta. Esta enfermedad puede ser causada por bacterias (actinomicetoma) u hongos (micetoma eumicético o eumicetoma). Los microorganismos reportados que causan actinomicetomas incluyen a *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y con menor frecuencia *N. asteroides*, *N. otitiscaviarum*, *N. transvalensis* y *Nocardioopsis dassonvillei*. En Norteamérica, Sudamérica, Australia y en nuestro país, *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal de actinomicetoma. En estudios previos, se observó que los pacientes con actinomicetoma producido por *Nocardia brasiliensis* reaccionaban con algunas proteínas de un extracto crudo de *N. brasiliensis* en un ensayo de Western blot. El suero de estos pacientes reaccionó mas intensa y específicamente con tres bandas de pesos moleculares aproximados de 24-, 26- y 61-kDa. De estas proteínas la P24 y P61 se aislaron y purificaron con métodos fisicoquímicos convencionales. De la proteína P61, se ha determinado la secuencia aminoacídica N-terminal (Sec. aminoacídica 1) y dos secuencias internas obtenidas por ruptura de la proteína mediante bromuro de cianógeno (Sec. aminoacídicas 2 y 3). Al comparar las secuencias aminoacídicas con la base de datos para proteínas del GenBank, mediante el sistema BLAST, se observó homología con catalasas de eucariotes y otros actinomicetos. Se realizó un análisis por alineamiento de las secuencias nucleotídicas de varios genes que codificaban para catalasas y se observaron varias secuencias consenso, una de ellas dentro de la secuencia aminoacídica No. 2 (FDLTKV). En base a esta secuencia y a otra secuencia consenso que se encontraba hacia el extremo 5' (VGNNTN) se prepararon oligonucleótidos degenerados denominados NB2 y NB3, respectivamente. Mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), y utilizando estos oligonucleótidos como iniciadores, se obtuvo un fragmento de 450-pb. En el presente trabajo de tesis, se examinó mediante PCR y Southern blot, 19 cepas de *Nocardia brasiliensis* pertenecientes al cepario del Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, así como también cepas tipo de los géneros *Actinomadura* sp., *Gordona* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp. para determinar la presencia de secuencias similares a la de *N. brasiliensis*.

**Contribuciones y Conclusiones.** Con los resultados obtenidos de PCR y Southern blot se contribuyó en la diferenciación de algunas especies pertenecientes al grupo de los Actinomicetos en base a la presencia o ausencia del fragmento *katN*. Con este estudio además se concluyó que existe polimorfismo entre las especies que son positivas para la presencia de este fragmento. La técnica de PCR, aunada al Southern blot, podría permitirnos en un futuro cercano el diagnóstico diferencial de los microorganismos causantes de micetoma.

FIRMA DEL ASESOR:



## ABREVIATURAS

<b>A</b>	<b>Adenina</b>
<b>bd</b>	<b>Bidestilada</b>
<b>°C</b>	<b>Grados centígrados</b>
<b>C</b>	<b>Citosina</b>
<b>CTAB</b>	<b>Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio</b>
<b>DAP</b>	<b>Acido 2,6-diaminopimélico</b>
<b>DNA</b>	<b>Acido desoxirribonucleico</b>
<b>DNTP</b>	<b>Desoxinucleótido</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acido Etilendiamino Tetraacético</b>
<b>fg</b>	<b>Fentogramo</b>
<b>g</b>	<b>Gramo</b>
<b>G</b>	<b>Guanina</b>
<b>HCl</b>	<b>Acido clorhídrico</b>
<hr/>	
<b>h</b>	<b>Hora</b>
<b>HUJEG</b>	<b>Hospital Universitario "José Eleuterio González" <sup>®</sup></b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>kpb</b>	<b>kilopares de bases</b>
<b>LIID</b>	<b>Lab. Interdisciplinario de Investigación Dermatológica</b>
<b>LMP</b>	<b>Low Melting Point (bajo punto de fusión)</b>
<b>LUV</b>	<b>Luz Ultravioleta</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloruro de Magnesio</b>
<b>µg</b>	<b>Microgramo</b>
<b>µL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramo</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>

<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de Sodio</b>
<b>NaOH</b>	<b>Hidróxido de Sodio</b>
<b>ng</b>	<b>Nanogramo</b>
<b>nm</b>	<b>Nanómetro</b>
<b>PAGE</b>	<b>Electroforesis en Gel de Poliacrilamida</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de Hidrógeno</b>
<b>pg</b>	<b>Picogramo</b>
<b>RNAr</b>	<b>Acido ribonucleico ribosomal</b>
<b>RNA'sa</b>	<b>Ribonucleasa</b>
<b>r.p.m.</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>S</b>	<b>Coefficiente de Sedimentación</b>
<b>SIDA</b>	<b>Síndrome de Inmunodeficiencia Humana</b>
<b>SSC</b>	<b>Solución Salina- Citrato</b>
<b>SDS</b>	<b>Sulfato Duodecil de Sodio</b>
<b>T</b>	<b>Timina</b>
<b>TAE</b>	<b>Tris-Acetato-EDTA</b>
<b>TE</b>	<b>Tris-EDTA</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris (Hidroximetil aminometano)</b>
<b>U</b>	<b>Unidad</b>
<b>v</b>	<b>Volts</b>

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Características Generales	1
1.2 Taxonomía	4
1.3 Clasificación	5
1.4 Identificación	6
1.5 Aspectos Epidemiológicos	8
1.6 Infección Cutánea	9
1.7 Antecedentes inmediatos	11
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo General	15
2.2 Objetivos Específicos	15
<b>3. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>16</b>
3.1 Estrategia general	16
3.2 Microorganismos y condiciones de cultivo	18
3.3 Extracción del DNA con Bromuro de Cetil-Trimetil de Amonio (CTAB)	20



**Capítulo**

**Página**

3.4	Determinación de Pureza del DNA por Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5 %.	22
3.5	Cuantificación del DNA	23
3.5.1	Método Espectrofotométrico	23
3.5.2	Por estándares de concentración	24
3.6	Determinación del fragmento NB10-NB11 por PCR de muestras de DNA de actinomicetos	25
3.7	Ensayos de Southern blot	26
3.8	Obtención del Amplicón NB10-NB11	29
3.9	Purificación del Amplicón NB10-NB11	30
3.10	Marcaje del Amplicón NB10-NB11	33
3.11	Hibridización	34
3.12	Lavado y detección	35
3.13	Límite de detección del método de PCR para fragmento NB10-NB11 de <i>Nocardia brasiliensis</i>	36
3.13.1	A partir de diluciones de DNA	36
3.13.2	A partir de diluciones celulares	38

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	41
4.2 Extracción del DNA con CTAB	41
4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores NB10-NB11	43

**Capítulo****Página**

4.4 Digestión Enzimática del DNA	48
4.5 Secuenciación del fragmento NB10-NB11	53
4.6 Límite de Detección del método de PCR	58
4.6.1. Límite de detección con diluciones de células	58
4.6.2. Límite de detección con diluciones de DNA	59

**5. DISCUSION**

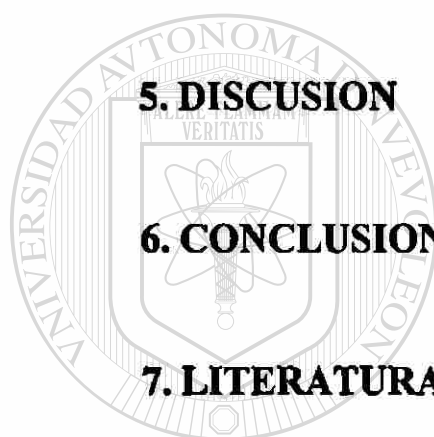
61

**6. CONCLUSIONES**

70

**7. LITERATURA CITADA**

71

**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

<b><u>Tabla</u></b>	<b><u>Página</u></b>
<b>1. Cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> de la colección del LIID (Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica) utilizadas en el presente estudio.</b>	<b>18</b>
<b>2. Especies de Actinomicetos utilizados en el presente estudio.</b>	<b>19</b>
<b>3. Mezcla utilizada en el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b>	<b>25</b>
<b>4. Resultados de los ensayos de PCR con DNA genómico de especies de <i>Nocardia</i> utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.</b>	<b>46</b>
<b>5. Resultados de los ensayos de PCR con DNA genómico de otros géneros de Actinomicetos utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.</b>	<b>47</b>
<b>6. Resultados de Southern blot utilizando la sonda NB10-NB11 y de PCR con iniciadores NB10-NB11 de especies de actinomicetos.</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1. Diagrama de la posible localización de las secuencias aminoacídicas internas y N-terminal del gen <i>katN</i> de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	13
2. Estrategia general utilizada para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo.	17
3. Sistema de transferencia Turboblotter para el paso del DNA del gel de Agarosa a un filtro de Nylon.	28
4. Obtención y purificación del amplicón NB10-NB11 a partir de DNA genómico de <i>Nocardia brasiliensis</i> .	32
5. Sistema de marcaje de la sonda NB10-NB11 con peroxidasa.	34
6. Límite de sensibilidad del método de PCR utilizado para la detección del fragmento NB10-NB11 a partir de diluciones de células y diluciones de DNA.	40
7. Cuantificación de DNA de especies de actinomicetos mediante el uso de estándares de concentración.	42
8. PCR de DNA genómico de cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> con iniciadores NB10-NB11.	43
9. PCR de DNA genómico de actinomicetos con iniciadores NB10 y NB11.	45



**Figura****Página**

10. Digestión enzimática de DNA genómico de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 con enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. 48
11. Cepas de *Nocardia brasiliensis* digeridas con la enzima de restricción *Bam*HI. 49
12. Southern blot de DNA de actinomicetos digeridos con la enzima *Bam*HI y utilizando la sonda NB10-NB11. 50
13. Southern blot de DNA de actinomicetos digeridos con la enzima *Bam*HI y utilizando la sonda NB10-NB11. 51
14. Secuencias nucleotídicas del fragmento NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR. 54
- 
15. Secuencias aminoacídicas codificadas por el fragmento NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR. 56
16. PCR de diluciones de células de *Nocardia brasiliensis* utilizando los iniciadores NB10-NB11. 58
17. PCR de diluciones de DNA de *Nocardia brasiliensis* utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4. 59

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Características Generales

El término de actinomicetos aeróbicos es una designación común de las bacterias que pertenecen al orden *Actinomycetales*. Originalmente, los microorganismos de este orden fueron clasificados como hongos debido a la presencia de hifas aéreas verdaderas, las cuales eran consideradas una característica peculiar de los hongos. Sin embargo, en base de sus componentes de pared celular, en particular de la composición de lípidos y peptidoglicano de la pared celular, estos microorganismos son ahora reconocidos como bacterias aeróbicas verdaderas. La mayoría de los actinomicetos son típicamente Gram positivos, filamentosos, parcialmente ácido-alcohol resistentes y ramificados, que tienen muchas características microbiológicas comunes entre sí (41).

La taxonomía de los actinomicetos que contienen ácidos micólicos, ha experimentado grandes cambios en base a datos derivados del uso de métodos taxonómicos modernos (24,30,41). Las bacterias que contienen ácidos micólicos tienen muchas características fenotípicas en común (16,30), forman una línea filogenética distinta (51) y han sido asignadas a los géneros *Corynebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Nocardia*,

*Rhodococcus* y *Tsukamurella* en base de algunos marcadores morfológicos y químicos (13,16,24,30).

Los miembros del género *Nocardia* forman hifas-substrato altamente ramificadas que se fragmentan *in situ* o después de perturbación mecánica hacia elementos no móviles de forma bacilar a cocoides; casi siempre se forman hifas aéreas y algunas veces son visibles solo microscópicamente (29,37). Las bacterias del género *Nocardia* son también caracterizadas por la presencia de ácido meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa en su peptidoglicano de pared celular (36). Poseen además ácido murámico en la forma N-glicosilada, junto con otros compuestos como difosfatidil glicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilinositol mánosidos como sus fosfolípidos predominantes. Estos microorganismos tienen grandes cantidades mayores de ácidos tuberculoesteáricos insaturados, de cadenas rectas y ácidos micólicos con 40 a 60 átomos de carbono. Su DNA es rico en G+C (G+C= 64 a 72 mol %) (16,29,30).

Los miembros del género *Nocardia* son bacterias filamentosas no móviles, aerobias, Gram positivas, las cuales pueden ser ácido-alcohol resistentes. Las especies patogénicas del género *Nocardia* se encuentran comúnmente en suelos de cualquier parte del mundo y en la materia orgánica (27). *Nocardia* sp. y bacterias relacionadas son consideradas

microorganismos saprófitos del suelo, primariamente responsables de la descomposición de material orgánico de las plantas (27,45,47). Las personas y los animales pueden infectarse vía inhalación, ingestión o inoculación traumática (3,6,49).

Una característica morfológica variable del género *Nocardia* incluye conidias bien desarrolladas en *N. brevicatena* y esporas menos desarrolladas en algunas cepas de *N. asteroides*. Las hifas aéreas que son visibles macroscópicamente pueden estar ausentes, dispersas o ser muy abundantes, y las colonias pueden tener una apariencia superficial lisa o mas comúnmente una apariencia agrietada. Los pigmentos celulares pueden ser de color blanco, gris, amarillo, naranja, rosa, coral, rojo, bronceado, café o púrpura (41).

Recientemente, los actinomicetos aeróbicos han surgido como organismos inusuales pero potencialmente patógenos para el humano, que pueden ser causa de morbilidad significativa, afectando no solo a pacientes severamente inmunocomprometidos sino también a hospederos inmunocompetentes. El número de pacientes inmunocomprometidos continúa incrementando como resultado de los avances tecnológicos modernos que han permitido la sobrevivencia de personas enfermas y en menor extensión al incremento en el número de pacientes infectados con el

virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El amplio uso de técnicas diagnósticas no invasivas han resultado en un avance en el entendimiento del potencial patogénico de muchos de estos microorganismos (41).

## **1.2 Taxonomía**

Los actinomicetos aeróbicos de importancia médica que han sido asociados con enfermedad humana han experimentado considerables revisiones taxonómicas recientes. El esclarecimiento de la taxonomía de estos microorganismos es necesario, y debería ser realizado por el uso de métodos moleculares desarrollados recientemente y que son más precisos. Las agrupaciones taxonómicas para estos microorganismos han sido basadas primariamente en características fenotípicas y análisis genéticos más simples, los cuales no siempre han sido completamente satisfactorios, por lo que existe una urgente necesidad de aplicar nuevas técnicas genéticas que establezcan definitivamente la taxonomía de los actinomicetos aeróbicos (41).

Durante las últimas dos décadas, se han realizado grandes avances en el desarrollo y aplicación de métodos nuevos y confiables para la clasificación bacteriana. En particular, técnicas tales como la identificación de aminoácidos y azúcares de la pared celular, azúcares de la célula

completa, ácidos grasos (incluyendo ácidos micólicos), menaquinonas, fosfolípidos y homología del DNA han proporcionado una gran utilidad para la taxonomía de los actinomicetos (21,26,65).

Comúnmente, los criterios quimiotaxonómicos usados para asignar bacterias al género de *Nocardia* incluyen también la presencia del meso-isómero del ácido 2,6 diaminopimélico (DAP), azúcares de la célula total, arabinosa y galactosa (36), ácidos micólicos de cadena intermedia (46 a 60 carbonos) (1,18,19,26,28,37) y un perfil de ácidos grasos que demuestre cantidades principales de ácidos tuberculoesteáricos, insaturados y de cadena recta (38). En el caso del complejo de *Nocardia asteroides* existen algunos exámenes que han establecido su heterogeneidad. Entre estos exámenes se incluyen la taxonomía numérica (4,9,45,57), análisis de ácidos micólicos por cromatografía de gas, homología del DNA (66) y patrones de resistencia a antibióticos.

### 1.3 Clasificación

Las especies del género *Nocardia* han sido clasificadas principalmente por usar datos químicos, taxonomía numérica, relación del DNA, sensibilidad a fagos, datos inmunológicos y susceptibilidad a antibióticos (11,12,16,24,30,60,61). Es importante distinguir entre

diferentes especies de *Nocardia* debido a que algunas especies causan una variedad de enfermedades supurativas en humanos y animales, principalmente actinomicetoma y nocardiosis (13,54). *Nocardia brasiliensis* es el principal agente causal de actinomicetoma (40,41) y los agentes predominantes de nocardiosis son *Nocardia asteroides*, *Nocardia farcinica* y *Nocardia nova* (54,61).

Los principales grupos del orden Actinomycetales son actinoplanetos, maduromicetos, actinomycetos nocardioformes y estreptomycetos. Se requiere el examen de cepas por métodos moleculares para confirmar relaciones basadas en indicadores químicos y morfológicos y para clasificar anomalías aparentes (41).

#### 1.4 Identificación

Algunos exámenes bioquímicos que diferencian las 3 principales especies patogénicas de *Nocardia*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*, incluyen la descomposición de la adenina, caseína, xantina, tirosina e hipoxantina. Sin embargo, estos métodos de identificación no diferencian el complejo *N. asteroides* de las especies de *Nocardia* no patogénicas como *N. carnea*, *N. amarae* y *N. brevicatena* o de especies de los géneros relacionados *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Gordona* o *Tsukamurella* (25,26,28).



Recientes avances en técnicas de tipificación molecular tales como el desarrollo del análisis del DNA, han demostrado ser técnicas específicas y rápidas para la identificación y epidemiología de muchas bacterias que son difíciles de identificar. Aunque tales técnicas no son inmediatamente aplicables en laboratorios de Microbiología Clínica, la correlación de los datos genéticos obtenidos con resultados fenotípicos de exámenes de identificación bioquímicos convencionales pueden permitir una identificación más precisa de especies de actinomicetos aeróbicos por un número limitado de exámenes bioquímicos (41).

Los patrones por endonucleasas de restricción ribosomal específicos de especie y de cepa han sido visualizados después de la hibridización del RNAr de 16 y 23 S (ribotipificación) de *Escherichia coli* a manchas genómicas de DNA de algunos géneros bacterianos (31).

Las diferencias específicas de especie en patrones de ribotipo han sido utilizadas exitosamente para identificar aislados de algunas especies bacterianas diferentes para las cuales los métodos de identificación convencionales pueden ser erróneos, complejos, extensos y técnicamente demandantes. Recientes reportes sobre la aplicación de ribotipificación para bacterias de importancia de salud pública han incluido a *Campylobacter* (43,50), *Legionella* (32,53), *Staphylococcus* (23) y *Leptospira* (46).



La aplicación de métodos de hibridación *in situ* pueden ser particularmente beneficiosos cuando los microorganismos son raros o tienen una morfología inespecífica (cocoides), como es el caso de *Rhodococcus equi* (17). Una tecnología avanzada importante y mas reciente ha sido el análisis por PCR de el RNAr de 16 S, el cual ha incrementado la sensibilidad de la detección de microorganismos que no pueden ser cultivados en medios artificiales.

### **1.5 Aspectos Epidemiológicos**

La morbilidad y la mortalidad asociada con nocardiosis no han sido bien determinadas debido a que al igual que con las infecciones fúngicas invasivas, no hay un sistema de reporte de casos. En 1976, en los Estados Unidos, Beaman y colaboradores intentaron medir la incidencia de nocardiosis en Norteamérica (5).

Durante la última década, ha habido un marcado incremento en el número de pacientes severamente inmunocomprometidos. Muchos de ellos son susceptibles al desarrollo de nocardiosis. Este hecho ha sido debido principalmente a los avances tecnológicos recientes, desarrollados para prolongar la vida de pacientes severamente enfermos que están

hospitalizados y en menor extensión a la reciente epidemia del SIDA. Debido a que el número de pacientes inmunocomprometidos no demuestra tendencia para estabilizarse o disminuir, las infecciones por *Nocardia* sp. probablemente continuarán emergiendo como enfermedades oportunistas importantes (41).

Las nocardiosis parecen tener una ligera predilección para afectar al sexo masculino y usualmente afecta a los adultos en su tercera o cuarta década. Las especies de *Nocardia* pueden causar enfermedad en la ausencia de cualquier factor predisponente o pueden ser oportunistas (22,48).

### 1.6 Infección Cutánea

En contraste a la nocardiosis diseminada y pulmonar invasiva, las cuales afectan predominantemente a pacientes inmunocomprometidos, la nocardiosis cutánea es usualmente una infección primaria que afecta aparentemente a individuos inmunocompetentes. Los mismos agentes etiológicos (*N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*) causan los tres tipos de infección; sin embargo *N. brasiliensis* predomina en la infección cutánea primaria (55).

La nocardiosis cutánea puede ser subdividida hacia cuatro tipos clínicos: micetoma, infección linfocutánea, infección de piel superficial

(absceso o celulitis) e involucramiento cutáneo secundario con enfermedad diseminada (35). La infección subcutánea o cutánea primaria producidas por actinomicetos usualmente resulta de la inoculación traumática con estos microorganismos, lo cual puede resultar debido a una variedad de actividades al aire libre o ocurrir durante una operación.

El micetoma es una enfermedad subcutánea, sin dolor, crónica, localizada y de progresión lenta. Usualmente involucra las extremidades inferiores y es caracterizada por tumefacción, nódulos subcutáneos, granulomas destructivos, deformidad y los tractos de senos descargan con canales intercomunicantes que exudan pus, frecuentemente con gránulos visibles macroscópicamente de varios tamaños y colores (2,10,15). El micetoma es una manifestación clínica de estado tardío de una infección

---

subcutánea producida por bacterias (actinomicetos que causan micetoma actinomicótico o actinomicetoma) u hongos (micetoma eumicético o eumicetoma).

Los microorganismos reportados que causan actinomicetomas incluyen a *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, y menos comúnmente *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *Nocardiosis dassonvillei* y *N. transvalensis*. En Norte América, Sudamérica, México y Australia, *N. brasiliensis* es la principal

causa de actinomicetomas; sin embargo, en Africa, *Streptomyces somaliensis* es el agente predominante (7). Estas infecciones más comúnmente afectan pacientes en áreas rurales en los países del Tercer Mundo. Los pacientes con estas infecciones crónicas pueden tener una historia de un daño traumático localizado menor (44,56).

### 1.7 Antecedentes Inmediatos

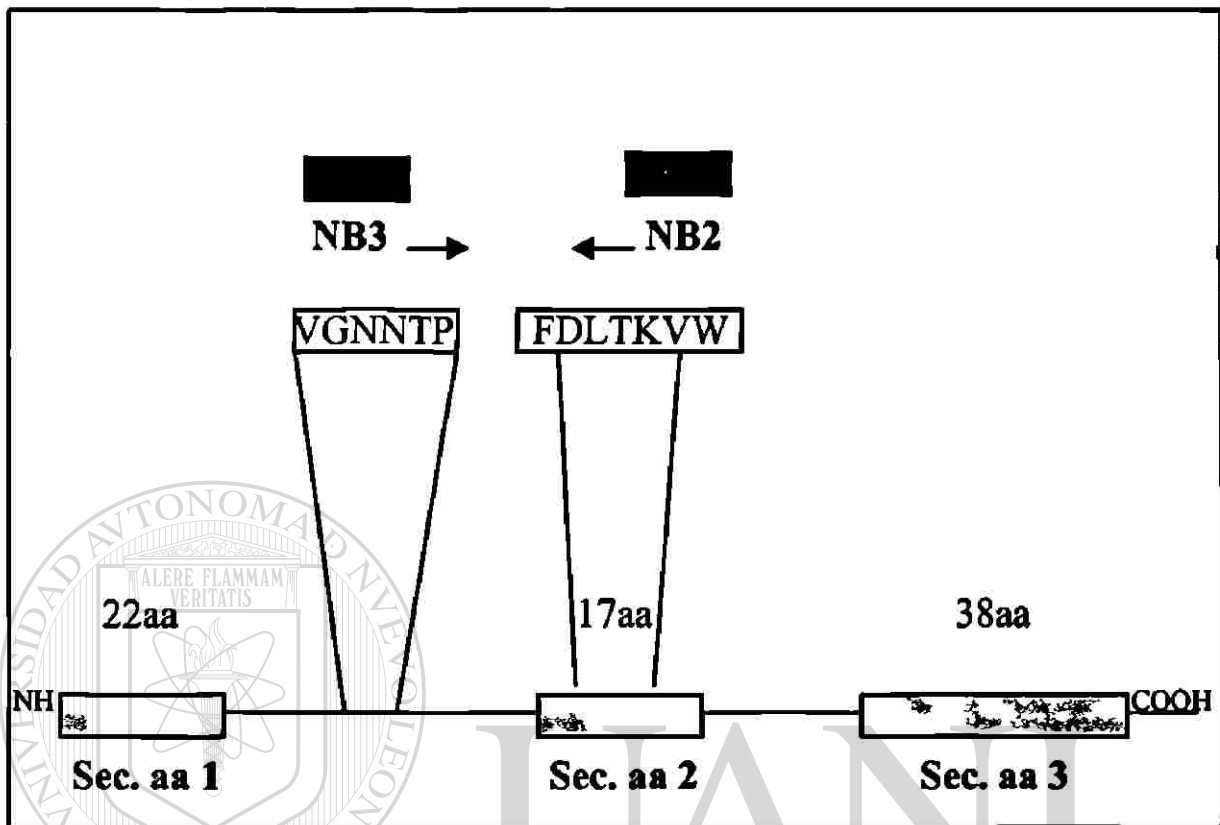
Recientemente se observó que el suero de pacientes con actinomicetoma producido por *Nocardia brasiliensis* reaccionan con algunas proteínas de un extracto crudo de *N. brasiliensis* en un ensayo de Western blot. El suero de estos pacientes reaccionó mas intensa y específicamente con tres bandas de pesos moleculares aproximados de 24-, 26- y 61-kDa (52).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

De estas proteínas, la P24 y P61 se aislaron y purificaron con métodos fisicoquímicos convencionales. Para purificar P61 se utilizó la precipitación con sulfato de amonio al 50 % de un extracto crudo y la proteína se purificó en un corrimiento en gel preparativo de SDS-PAGE con poliacrilamida al 12 %. La proteína P24 fue aislada utilizando cromatografía por filtración en gel (columna de Sephadex G-100 de

SIGMA) y dializada y concentrada por liofilización. Posteriormente fue purificada por corrimiento en un Sistema Laemmli preparativo no desnaturizante con un gel de corrimiento al 12 % y un gel de empaquetamiento al 5 % (58).

De una de las proteínas, P61, se ha determinado la secuencia aminoacídica N-terminal (Sec. aminoacídica 1) y dos secuencias internas obtenidas por ruptura de la proteína mediante bromuro de cianógeno (Sec. aminoacídicas 2 y 3) (Figura 1). Al comparar las secuencias aminoacídicas con la base de datos para proteínas de GenBank, mediante el sistema BLAST, se observó homología con catalasas de eucariotes y otros actinomicetos (59), por lo que se le atribuyó función de catalasa. Esta función se confirmó por acción de la proteína sobre el Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y por el método de tinción doble con Tetraclorhidrato de 3-3' diaminobencidina y Ferricianuro de Potasio sobre un gel de poliacrilamida no desnaturizante (62). Posteriormente se realizó un análisis por alineamiento de las secuencias nucleotídicas de varios genes que codificaban para catalasas y se observaron varias secuencias consenso, una de ellas dentro de la secuencia aminoacídica No.2 (FDLTKV).



**FIGURA 1.** Diagrama de la posible localización de las secuencias aminoacídicas internas y N-terminal del gen *katN* de *Nocardia brasiliensis* en base al gen *bca* de *Streptomyces violaceus*. Sec. aa representa las secuencias aminoacídicas de P61 obtenidas.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En base a esta secuencia (FDLTKVW) y a otra secuencia consenso que se encontraba hacia el extremo 5' (VGNNTTP) del gen de la catalasa de *Streptomyces violaceus* se prepararon oligonucleótidos degenerados denominados NB2 y NB3, respectivamente. Mediante PCR y utilizando estos oligonucleótidos como iniciadores se obtuvo un fragmento de 450-pb

cuya secuencia fue muy similar a la de la catalasa-bromoperoxidasa de *Streptomyces violaceus*.

En el presente trabajo nos propusimos estudiar la distribución de esta secuencia en otras especies patógenas del género *Nocardia* para determinar si esta secuencia era exclusiva de *Nocardia brasiliensis* o si existían secuencias idénticas o parecidas en las especies de *Nocardia* analizadas. También fue importante determinar si esta secuencia se encontraba en *Nocardia asteroides* debido a que es una especie muy relacionada a *Nocardia brasiliensis*. Dado que otros microorganismos están relacionados bioquímicamente y genéticamente al género *Nocardia* también se analizaron por Southern blot, DNA proveniente de cepas de *Actinomadura* sp., *Gordona* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp. Finalmente se estandarizó también una prueba de PCR específica para detectar este fragmento y determinar el límite de detección de la prueba.

## 2.1 Objetivo General

Determinar la presencia de una secuencia nucleotídica (*katN*) de la proteína p61 de *Nocardia brasiliensis* en diversas especies de actinomicetos.

## 2.2 Objetivos Específicos

- 1.-Determinar si el fragmento NB10-NB11 del gen *katN* existe en todas las cepas de *Nocardia brasiliensis* a analizar.
- 2.-Evaluar la presencia de esta secuencia o secuencias relacionadas en otras especies de *Nocardia* y de los géneros *Actinomadura* sp., *Gordona* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp. mediante PCR.
- 3.-Corroborar los resultados del objetivo anterior mediante ensayos de Southern blot.
- 4.-Desarrollar un método de amplificación genética (PCR) específico para detectar este fragmento, y determinar su límite de detección.



### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 Estrategia General

En la figura 2 se muestra la estrategia general que se siguió para cumplir con los objetivos que se plantearon en la realización de la tesis. Nosotros partimos de cultivos de actinomicetos que fueron cultivados en agar Sabouraud por un tiempo de 3 a 10 días. De estos cultivos llevamos a cabo la extracción del DNA, con el cual realizamos los ensayos de PCR para detectar la presencia del fragmento NB10-NB11 del gen de la catalasa de *Nocardia brasiliensis*.

Por otro lado, las muestras de DNA fueron utilizadas para realizar digestiones enzimáticas con *Bam*HI y *Eco*RI para posteriormente ser usadas en los ensayos de Southern blot. Como sonda utilizamos un amplicón NB10-NB11 que se marcó con peroxidasa utilizando el kit ECL (Amersham, Illinois, USA).

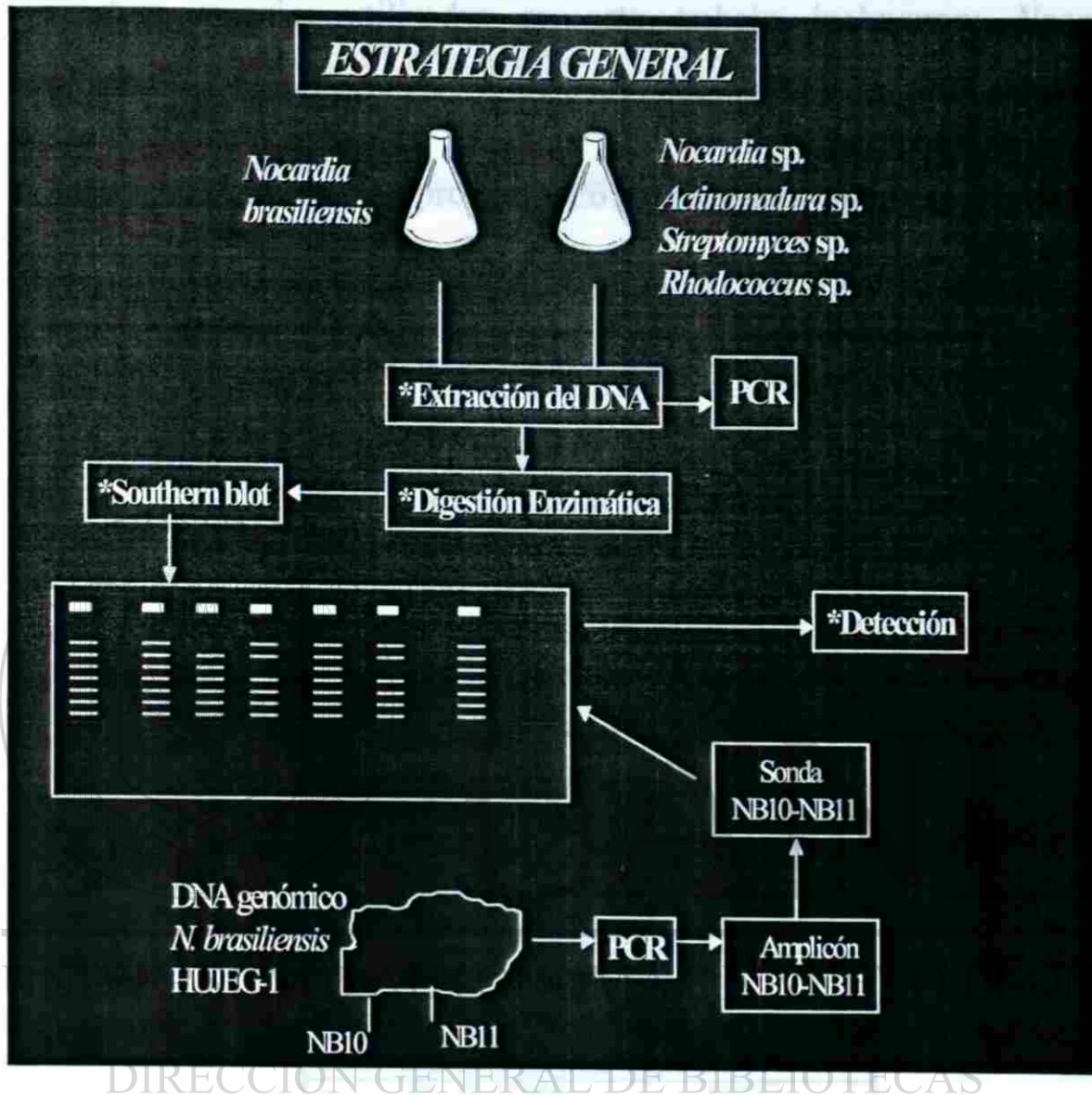


FIGURA 2-- Estrategia general utilizada en el trabajo de tesis.

### 3.2 Microorganismos

Las especies utilizadas en este trabajo incluyeron: *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 la cual ha sido utilizada en trabajos previos y de la cual se obtuvo la proteína P61 (catalasa) para purificación y secuenciación aminoacídica. Se analizaron además 17 cepas de *Nocardia brasiliensis* obtenidas de la colección del Servicio de Dermatología, del Hospital Universitario "José Eleuterio González" (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Cepas de *Nocardia brasiliensis* de la colección del LIID (Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica), Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "Jose E. González" utilizadas en este estudio.

CEPA
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa HUJEG-1
<i>Nocardia brasiliensis</i> NCTC 10300
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 1
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 5
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 7
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 8
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 13
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 22
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 31
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 32
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 33
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 38
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 48
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 51
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 53
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 54
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 81
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 84
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 91



También se incluyeron cepas tipo de los géneros *Nocardia*, *Actinomadura*, *Gordona*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Tsukamurella* (Ver Tabla 2).

**Tabla 2.** Otras especies de actinomicetos, diferentes a *N. brasiliensis*, utilizados en este estudio.

ESPECIE
<i>Nocardia asteroides</i> NCTC 6761
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 91005
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 91352
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 930637
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 940238
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 950355
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 960153
<i>Nocardia brevicatena</i> ATCC 15333
<i>Nocardia carnea</i> ATCC 06847
<i>Nocardia farcinica</i> NCTC 11134
<i>Nocardia nova</i> ATCC 33726
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> NCTC 1934
<i>Nocardia transvalensis</i> ATCC 6865
<i>Actinomadura madurae</i> NCTC 5654
<i>Actinomadura pelletieri</i> ATCC 33685
<i>Gordona bronchialis</i> ATCC 25582
<i>Gordona rubropertinctus</i> ATCC 14352
<i>Gordona sputi</i> ATCC 33610
<i>Gordona terrae</i> ATCC 25594
<i>Rhodococcus aichiensis</i> ATCC 33611
<i>Rhodococcus chubuensis</i> ATCC 33609
<i>Rhodococcus coprophilus</i> ATCC 29080
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939
<i>Rhodococcus luteus</i> ATCC 35014
<i>Rhodococcus maris</i> ATCC 35013
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 13808
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 03004
<i>Streptomyces griseus</i> NCTC 4523
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC 8664
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970
<i>Streptomyces somaliensis</i> ATCC 19437
<i>Streptomyces somaliensis</i> ATCC 33201
<i>Tsukamurella paurometabolum</i> ATCC 25938

Los cultivos de las cepas utilizadas para preparar biomasa fueron cultivadas en botellas con agar inclinado de Dextrosa-Sabouraud (Difco, Detroit, Michigan); estos cultivos se incubaron de 7 a 10 días a 30 °C. Cuando se observó el crecimiento máximo, los cultivos fueron examinados para determinar pureza. Posteriormente se inactivaron con calor a 80 °C por 30 minutos, se cosecharon por centrifugación y se lavaron con agua destilada para eliminar restos del medio de cultivo.

### **3.3 Extracción del DNA con Bromuro de Cetil-Trimetil de Amonio (CTAB).**

Para la extracción del DNA se utilizó la técnica del bromuro de cetil-trimetil amonio (63). De los cultivos crecidos en agar Dextrosa-Sabouraud se transfirieron de 2 a 3 asadas de cada especie de bacterias a tubos limpios y estériles que contenían agua estéril. Posteriormente se inactivaron las células con calor por 30 minutos a 80 °C en baño maría. Ya inactivadas las bacterias se molieron con varillas de vidrio con extremo redondeado hasta que se formó una suspensión homogénea (sin la presencia de conglomerados de células).

Después se lavaron dos veces con agua destilada estéril y las suspensiones celulares se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL

(Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y.). Se centrifugaron y se decantó el sobrenadante. Los paquetes celulares se resuspendieron en 500  $\mu$ L de buffer Tris-EDTA (TE), pH 8.0. Se agregaron 50  $\mu$ L. de lisozima 10 mg/mL (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, U.S.A.). Los tubos se incubaron por 2 horas a 37 °C en un baño de agua con agitación constante (Precision Scientific Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.). Se añadieron 70  $\mu$ L. de SDS al 10 % y 6  $\mu$ L. de Proteinasa K 10 mg/mL (BioRad Laboratories, Richmond, California) y se incubaron por 10 horas a 37 °C con agitación suave y constante.

Después de transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 100  $\mu$ L de NaCl 5 M y se agitó levemente. En seguida, se agregaron 80  $\mu$ L de solución de CTAB/NaCl. Se agitó lentamente hasta formar una suspensión blanquecina. Se incubó a 65 °C por 10 minutos. Se agregó un volumen igual (aprox. 700  $\mu$ L) de cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1 y se agitó el tubo hasta homogenizar completamente. Se procedió a centrifugar la muestra a temperatura de laboratorio por 5 minutos a 3000 r.p.m. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol frío concentrado. Se agitó suavemente el tubo hasta observar la formación de hebras de DNA.

Las hebras de DNA se transfirieron a un tubo limpio y estéril en donde se lavaron dos veces con 750  $\mu$ L de etanol al 70 %. En ambas ocasiones se removió el etanol con una micropipeta. La hebra de DNA se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente resuspenderla en 200  $\mu$ L. de buffer TE 1X en donde se almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis.

### **3.4 Determinación de Pureza del DNA por Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5%.**

Se colocaron 0.39 g de Agarosa (Gibco BRL, New York, U.S.A.) en un matraz de Erlenmeyer y se agregaron 26 mL de buffer TAE 1X. Se disolvió con calor y agitación constante. Después se dejó enfriar hasta aproximadamente 55 °C y se agregaron 5  $\mu$ L de Bromuro de Etidio 10 mg/mL (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.).

La agarosa se vació en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar. Se retiraron el peine y los contenedores y se agregó más buffer TAE 1X a la cámara hasta que alcanzó aproximadamente 1 mm sobre el gel de agarosa. Se mezclaron 8  $\mu$ L de los extractos de DNA obtenidos con 2  $\mu$ L de buffer de carga 5X y se cargaron en los pozos del gel. Se colocaron los electrodos y los geles se corrieron por 1 hora a 60 volts. La calidad del

DNA se determinó por examen de los geles con luz ultravioleta, en donde la presencia de bandas únicas nos determinaba una buena calidad y en cambio la presencia de barridos de DNA nos indicaba que la muestra no era óptima para utilizarla en exámenes posteriores.

### 3.5 Cuantificación del DNA

Para la cuantificación del DNA se utilizaron dos métodos:

#### 3.5.1 Método Espectrofotométrico.

Se colocó 1 mL de buffer TE 1X en una celda para luz ultravioleta (LUV) y se calibró el espectrofotómetro a 0 de absorbancia. Se añadieron 10  $\mu$ L de muestra, se mezclaron por inmersión y se tomó las lecturas de absorbancia a 260 nm.

La concentración del DNA se determinó con el siguiente cálculo:

$$[\text{DNA}] = (\text{Factor de dilución}) * (\text{Factor de conversión a ng}/\mu\text{L}=50) \\ (\text{Lectura de absorbancia a 260 nm}).$$

$$* \text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen total en la celda}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

La concentración resultante se expresó en ng/ $\mu$ L.



### **3.5.2 Comparación contra Estándares de Concentración.**

Los estándares de cuantificación de DNA (Gibco BRL, New York, U.S.A.) fueron diseñados para cuantificar DNA de doble cadena en geles teñidos con Bromuro de Etidio. El sistema consiste de 6 soluciones estandarizadas de DNA de fago  $\lambda$  a diferentes concentraciones. Se utilizaron estándares de concentración de 15, 31, 63, 125, 250 y 500 ng/6  $\mu$ L. De cada uno de los estándares se tomaron 6  $\mu$ L que fueron calentados por 10 minutos a 65 °C y enfriados en hielo antes de su uso. Estos estándares fueron colocados en los pozos de un gel de agarosa al 1 % y el tamaño se determinó utilizando un marcador de 1 kpb (Gibco BRL, New York, U.S.A.).

El buffer utilizado en la electroforesis fue Tris-Acetato y contenía Bromuro de Etidio, 0.5  $\mu$ g/mL. La electroforesis fue realizada a 50 V hasta que el Azul de Bromofenol recorrió 2/3 partes de la longitud del gel. En los pozos también se colocó 1  $\mu$ L de las muestras de DNA al lado de los estándares de concentración. La intensidad de las bandas fue proporcional a la concentración del DNA.

### 3.6 Determinación del fragmento NB10-NB11 por PCR de muestras de DNA de Actinomicetos

Las muestras de DNA de los diferentes actinomicetos en estudio fueron examinados para determinar la presencia del fragmento NB10-NB11 del gen de la catalasa de *N. brasiliensis*.

Estas muestras se ajustaron a una concentración de 20 ng/ $\mu$ L para ser utilizados en el ensayo de PCR. En la Tabla 3 se muestra la mezcla utilizada en el ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**Tabla 3.** Mezcla utilizada en el ensayo de PCR.\*

REACTIVO	VOLUMEN
<i>H<sub>2</sub>O</i> bidestilada	12.5 $\mu$ L
<i>MgCl<sub>2</sub></i> 25 mM	2.5 $\mu$ L
Buffer DNA TaqPolimerasa 10X	2.5 $\mu$ L
Iniciadores 50 ng/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
DNTP's 10 mM	2.5 $\mu$ L
Taq Polimerasa 5 U/ $\mu$ L	0.05 $\mu$ L

\* Esta mezcla se agregó a 2.5  $\mu$ L del DNA 20 ng/ $\mu$ L.

El programa de PCR que se utilizó fue el siguiente. Un período inicial de desnaturalización a 94°C por 1 minuto. Después un periodo de desnaturalización de 92°C por 40 segundos. La alineación de los iniciadores se llevó a cabo a 60°C por 40 segundos. Se dio un período de extensión a 75°C por 1.5 min. Estas tres temperaturas se repitieron 30 veces en un termociclador PTC-200 de MJ Research (Watertown, Mass., U.S.A.). Finalmente se dio un período final de extensión de 5:00 minutos a 75°C.

Se examinaron las muestras obtenidas por PCR en geles de Agarosa al 1.5% para determinar la presencia de bandas correspondientes al fragmento NB10-NB11 (250 pb aprox.). Como marcadores de peso molecular se utilizó la escala de 100 pb (100-bp ladder, Gibco BRL).

---

### 3.7 Ensayos de Southern blot

Debido a que las reacciones de PCR pueden ser negativas si hay polimorfismo o deleciones en los sitios de alineación de los iniciadores corroboramos los resultados de PCR mediante Southern blot.

Como primera referencia necesitábamos saber el tamaño del fragmento de DNA que contiene este gen en *N. brasiliensis*. Idealmente necesitábamos utilizar un ensayo que nos diera una sola banda en el

Southern blot. Para ello utilizamos, en ensayos preliminares, varias enzimas para cortar el DNA de *N. brasiliensis* HUJEG-1 y elegimos *Bam*HI por dar una sola banda de hibridización. Las muestras de DNA a analizar se digirieron con la siguiente mezcla:

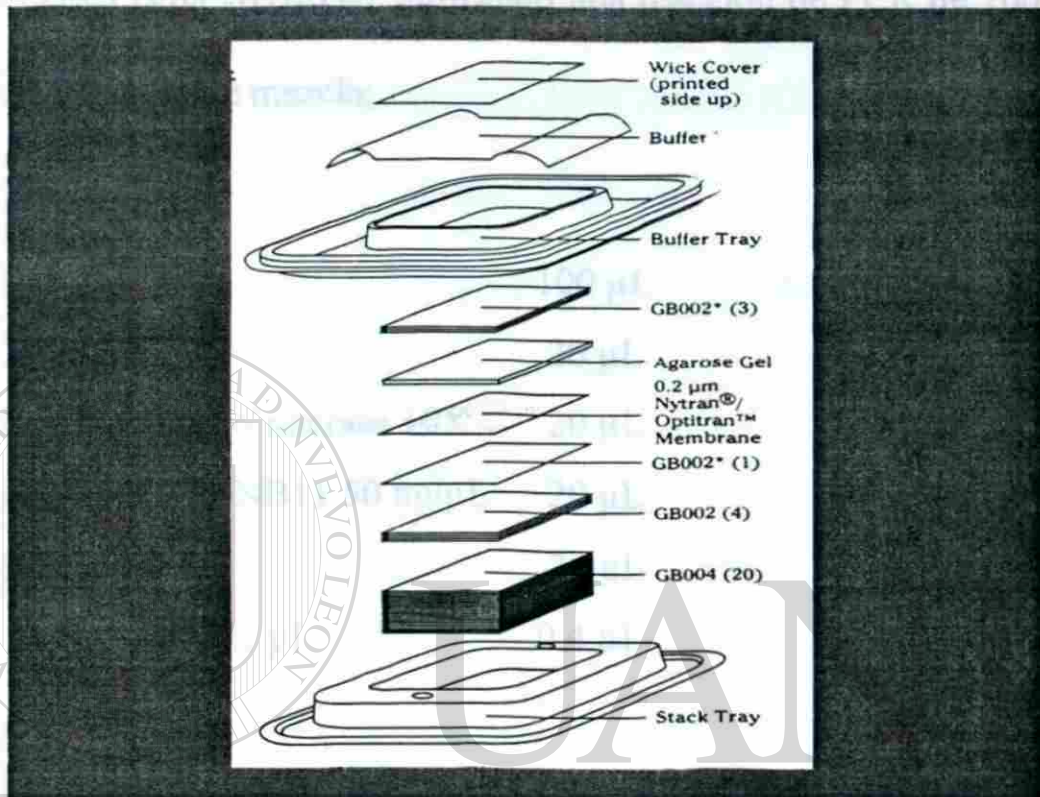
Se mezclaron 1  $\mu$ L de buffer 3 específico para la enzima *Bam*HI con 0.15  $\mu$ L de RNA'sa 10 mg/mL. En seguida se agregaron 0.5  $\mu$ L de la enzima de restricción 10 u/ $\mu$ L y finalmente se adicionaron 4  $\mu$ g de DNA. Se completó a un volumen de 10  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y se incubó por un tiempo de 4 a 6 horas a 37°C. La mezcla de la digestión enzimática fue posteriormente analizada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Los 10  $\mu$ L de la reacción se mezclaron con 1  $\mu$ L de buffer de carga y se dejó corriendo a 25 volts durante toda la noche.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

Los geles obtenidos con los digeridos enzimáticos se les trató de la siguiente manera: Se sumergieron en HCl 0.25 M por un tiempo de 10 minutos con agitación suave y constante. De aquí los geles se les quitó el exceso de HCl 0.25 M y se colocaron en un recipiente conteniendo NaOH 0.25 M. En este recipiente se dejaron por 30 minutos con agitación constante.

Posteriormente se llevó a cabo la transferencia utilizando el Sistema Turboblotter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) mostrado en la **Figura 3.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**FIGURA 3.-**Sistema de Transferencia Turboblotter para el paso del DNA de gel de agarosa a un filtro de Nylon (marca Nytran).

### 3.8 Obtención del Amplicón NB10-NB11

El amplicón NB10-NB11 que utilizamos como sonda en los ensayos de Southern blot se obtuvo a partir de DNA genómico de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 utilizando una reacción de PCR de 200  $\mu$ L que incluía la siguiente mezcla:

H <sub>2</sub> O bd	100 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	20 $\mu$ L
Buffer DNA TaqPolimerasa 10X	20 $\mu$ L
Iniciadores NB10-NB11 50 ng/ $\mu$ L	20 $\mu$ L
DNTP's 10 mM	20 $\mu$ L
Taq Polimerasa 5 U/ $\mu$ L	0.4 $\mu$ L

El programa de PCR que se utilizó incluyó los siguientes pasos:

94°C - 1:00 minuto

92°C - 40 segundos

60°C - 40 segundos

75°C - 1:30 minutos

75°C - 5:00 minutos

4°C - Final

} 30 ciclos



### 3.9 Purificación del Amplicón NB10-NB11

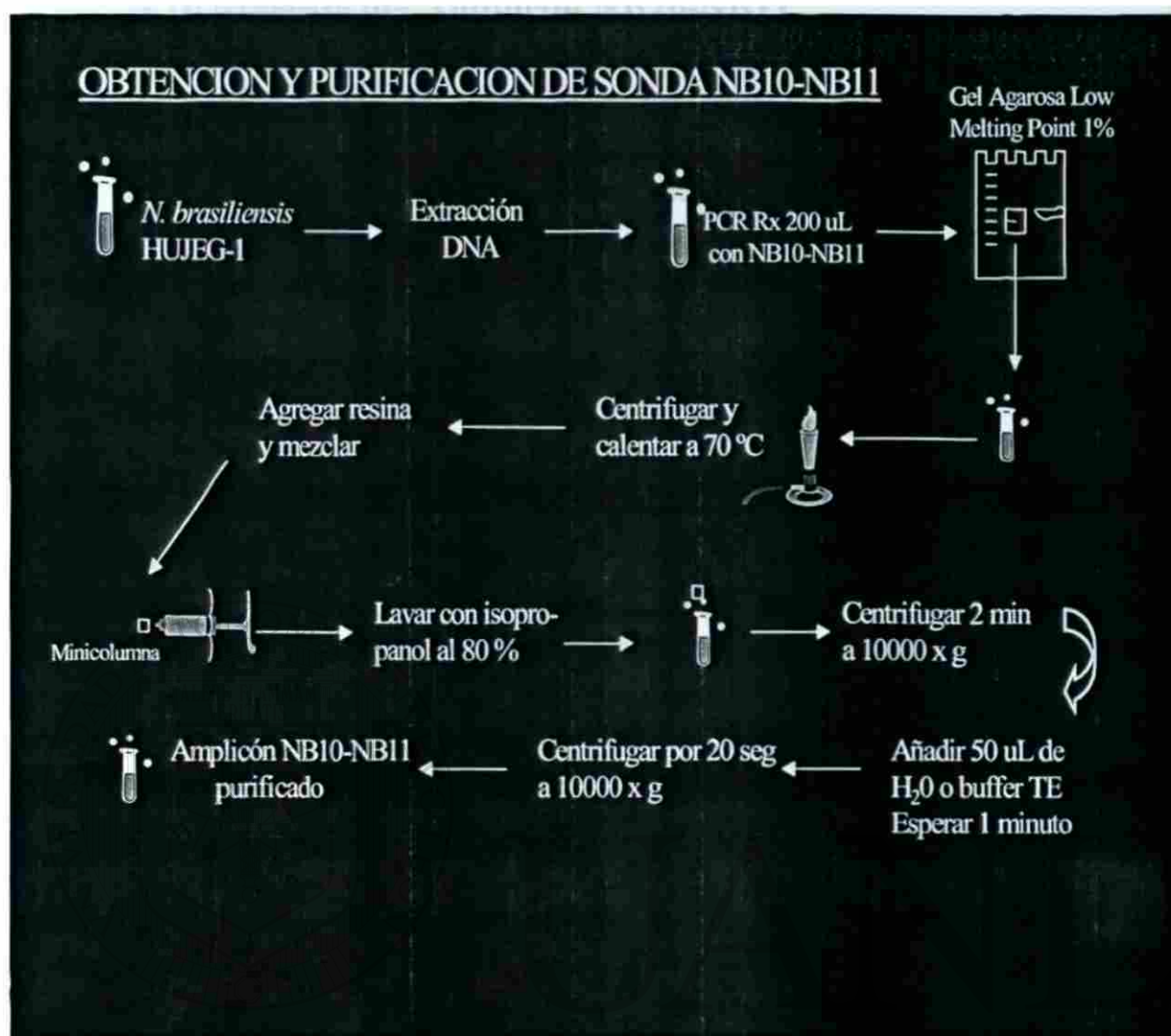
La purificación del amplicón se obtuvo según la Figura 4, en donde la muestra conteniendo el amplicón NB10-NB11 se corrió en un gel de Agarosa de Bajo Punto de Fusión (LMP) al 1 % (Gibco BRL, New York, U.S.A.) que se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron 0.30 g de Agarosa de Bajo Punto de Fusión (LMP) y se agregaron 30 mL de buffer TAE 1X. El matraz se calentó hasta disolver completamente la agarosa. Esta se dejó enfriar y se agregaron 5  $\mu$ L de Bromuro de Etidio, 10 mg/mL. Después al solidificar se retiró el peine y los contenedores.

Posteriormente se agregaron la muestra del amplicón (200  $\mu$ L) y el marcador de Peso Molecular de 100 pb a los pozos del gel y se corrió la Electroforesis por 1 hora a 60 Volts. Con la ayuda de la lámpara de luz Ultravioleta se localizó la zona del gel que contenía el amplicón NB10-NB11 y se cortó con un bisturí para colocarlo en tubos Eppendorf. El gel conteniendo al amplicón se calentó a 70°C para licuarlo. Para la purificación se utilizó el kit Wizard PCR Preps (Promega, WI, U.S.A.) en donde se procedió de la siguiente manera:

Se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de resina antes de solidificarse y se agitó vigorosamente. La mezcla se pasó a través de una minicolumna. Esta minicolumna se lavó dos veces con Isopropanol al 80 % (1 mL en cada lavado). Se centrifugó a 12000 r.p.m. por 1 minuto y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua caliente directamente al filtro sin tocarlo y se esperó un minuto para permitir la disolución del DNA. Se centrifugó a 12000 r.p.m. por un minuto y se utilizó otro tubo Eppendorff limpio y estéril como receptor del amplicón ya purificado. Este amplicón NB10-NB11 se guardó a 4°C hasta su utilización. Antes de utilizarse en los ensayos de Southern blot, el amplicón NB10-NB11 fue cuantificado al compararlo contra estándares de concentración en un gel de Agarosa al 1.5 %. Los estándares utilizados fueron marcadores de 100-pb a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$ .





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

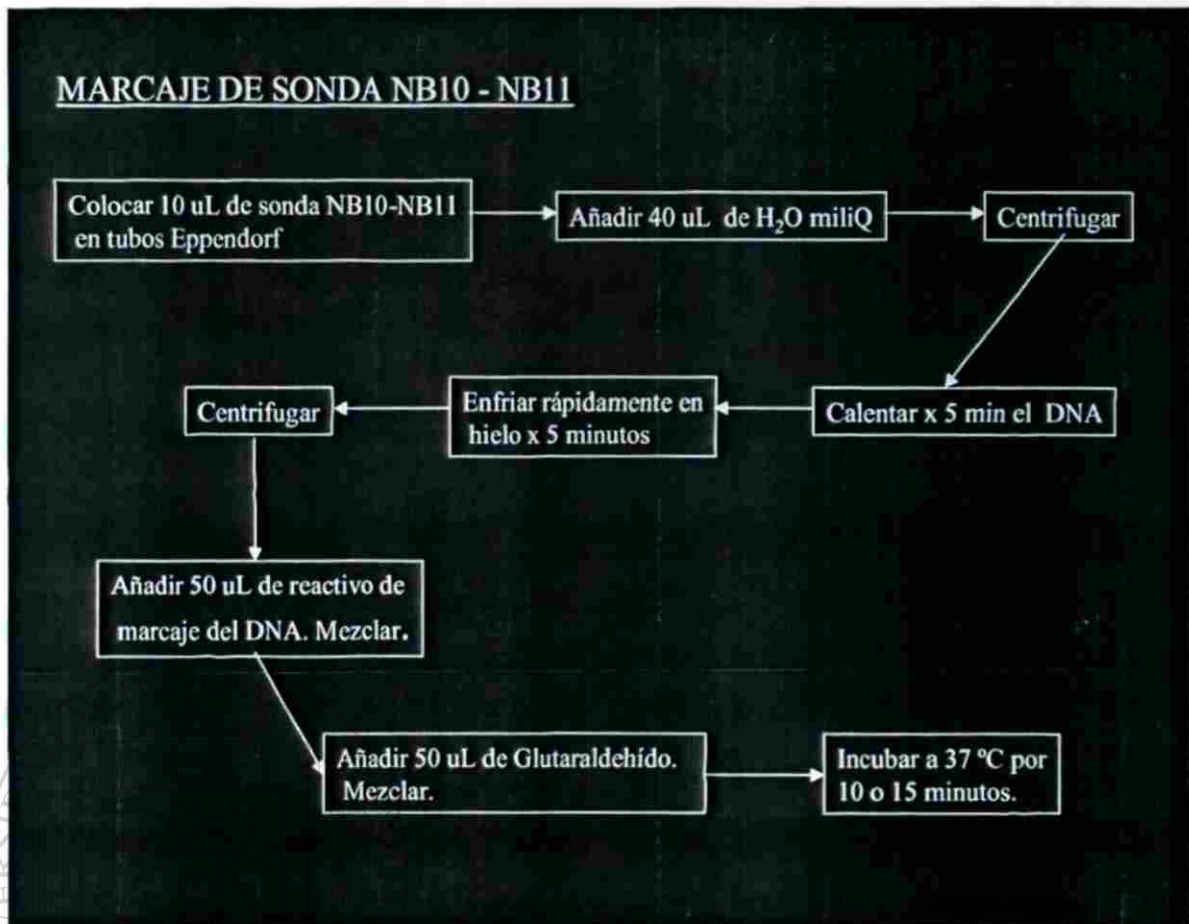
**FIGURA 4.-**Obtención y purificación del amplicón NB10-NB11 a partir de DNA genómico de *Nocardia brasiliensis*.

### 3.10 Marcaje del Amplicón NB10-NB11

En la figura 5 se resume la metodología utilizada para el marcaje del amplicón NB10-NB11, en donde se colocaron 6  $\mu\text{L}$  del Amplicón NB10-NB11 (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) en tubo Eppendorff. Se agregaron 44  $\mu\text{L}$  de agua miliQ estéril y se centrifugaron a 12000 r.p.m. por 30 segundos. El tubo conteniendo al amplicón se calentó a ebullición por un tiempo de 5 minutos.

Después de este tiempo se pasó a hielo inmediatamente y se dejó aquí por un tiempo de 5 minutos, con el objetivo de mantener separadas las cadenas de DNA. Se centrifugó otra vez por 30 segundos para llevar al fondo del tubo el volumen total de la muestra. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de marcaje (Peroxidasa) y se mezcló el tubo vigorosamente.

Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de Glutaraldehído para enlazar covalentemente la Peroxidasa al amplicón. Se mezcló bien y se centrifugo brevemente en la microcentrífuga para coleccionar el contenido en el fondo del tubo. Después se incubó a 37 ° C por 10 minutos. Ya marcada la sonda se agregó a los tubos de Hibridización.



**FIGURA 5.-**Sistema de Marcaje de la sonda NB10-NB11 con Peroxidasas (Kit ECL, Amersham, Illinois, USA).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

### 3.11 Hibridización GENERAL DE BIBLIOTECAS

El filtro de Nylon marca Nytran que contenía el DNA digerido enzimáticamente se humedeció con SSC 2X y se colocó sobre una malla de Nylon. El filtro y la malla se envolvieron y se colocaron en un tubo de hibridización en donde se agregaron 80 mL de SSC 2X para pegar la malla a la pared del tubo de hibridización y después se retiró el SSC 2X.

Se añadieron 10 mL de Buffer de Hibridización precalentado (ECL, Amersham, Illinois) y se colocó el tubo en el horno de Hibridización marca Autoblot (Bellco glass, Inc., Vineland, N.J., U.S.A.). Se dejó 1 hora a 42 °C cuidando que no se formarán burbujas en el tubo. Después de la hora se agregó la sonda cuidando de no tocar el filtro de Nylon marca Nytran (se tomaron 0.5 mL de buffer de hibridización y se mezclaron con la sonda, se agregaron al fondo del tubo de hibridización sin tocar el filtro y se lavaron las puntillas 1 ó 2 veces). El filtro junto con la sonda NB10-NB11 se dejaron toda la noche incubando a 42 ° C.

### 3.12 Lavado y Detección

Después de la incubación se retiró la sonda NB10-NB11. El filtro se lavó dos veces con Buffer de Lavado Primario (SDS al 0.4 % y SSC 0.5 X) a 55 ° C por 10 minutos cada lavado y se mantuvo en el horno. Después se lavó dos veces con Buffer de Lavado Secundario (SSC 2 X) a temperatura ambiente en un recipiente por 5 minutos cada lavado. El exceso de Buffer de Lavado Secundario se retiró y el filtro fue colocado en un recipiente, en donde se agregaron 10 mL de reactivo de detección 1 y 10 mL de reactivo de detección 2 (kit ECL, Amersham, Illinois).

Se humedeció todo el filtro con los reactivos y se incubó con el substrato por 2 minutos. Después de este tiempo se secó el papel filtro para remover el exceso de reactivos de detección y se envolvió en papel Saran Wrap. El filtro se colocó un Hypercassette™ de 18 X 24 cm (Amersham Life Science, England). Después en un cuarto oscuro se colocó una hoja de autorradiografía (Hyperfilm™-ECL™, Amersham Life Science, England) y se expuso por un tiempo de 5 minutos. En seguida se removió la hoja de autorradiografía y se reveló.

### **3.13 Límite de Detección del método de PCR para fragmento NB10-NB11 DE *Nocardia brasiliensis***

El límite de detección del método de PCR se determinó mediante dos procedimientos mostrados en la Figura 6.

#### **3.13.1 Límite de detección a partir de una muestra con concentración conocida de DNA.**

Se prepararon 100  $\mu\text{L}$  de una solución de DNA 4  $\text{ng}/\mu\text{L}$  que fueron cuantificados con los estándares de masa para ser mas exactos. De aquí se realizaron diluciones a partir de esta solución. Las diluciones que se prepararon fueron las siguientes:

0.4 ng/ $\mu$ L, 40 pg/ $\mu$ L, 4 pg/ $\mu$ L, 0.4 pg/ $\mu$ L, 40 fg/ $\mu$ L, 4 fg/ $\mu$ L, 0.4 fg/ $\mu$ L, 0.04 fg/ $\mu$ L y 0.004 fg/ $\mu$ L.

De cada dilución se tomaron 2.5  $\mu$ L que se mezclaron con los siguientes reactivos para llevar a cabo PCR utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4:

H <sub>2</sub> O bd	12.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.5 $\mu$ L
Buffer PCR Taq Pol 10 X	2.5 $\mu$ L
NB10-NB11 50 ng/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
NOC3-NOC4 50 ng/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
DNTP's 10 mM	2.5 $\mu$ L
Taq Polimerasa 5U/ $\mu$ L	0.05 $\mu$ L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Se realizó el siguiente método de PCR en el Termociclador PTC 200: <sup>®</sup>

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

92 °C - 1 minuto

92 °C - 60 segundos	} 30 ciclos
60 °C - 60 segundos	
72 °C - 60 segundos	

72 °C - 10 minutos

### **3.13.2 Límite de detección a partir de una muestra con concentración conocida de células.**

A partir de un cultivo de células de *Nocardia brasiliensis* crecidas en agar Sangre se pasaron algunas asadas a un tubo de ensayo limpio y estéril que contenía de 2 a 3 gotas de agua estéril. Las bacterias se molieron con varilla de vidrio hasta que se formó una solución homogénea.

Después a la suspensión se agregaron 5 mL de agua bidestilada estéril y se centrifugo a baja velocidad (600 - 900 r.p.m.) por un tiempo de 10 minutos para dejar en suspensión solo las células que se encontraban en forma individual o en fragmentos cortos. El sobrenadante fue examinado al microscopio para determinar si las células estaban en forma individual.

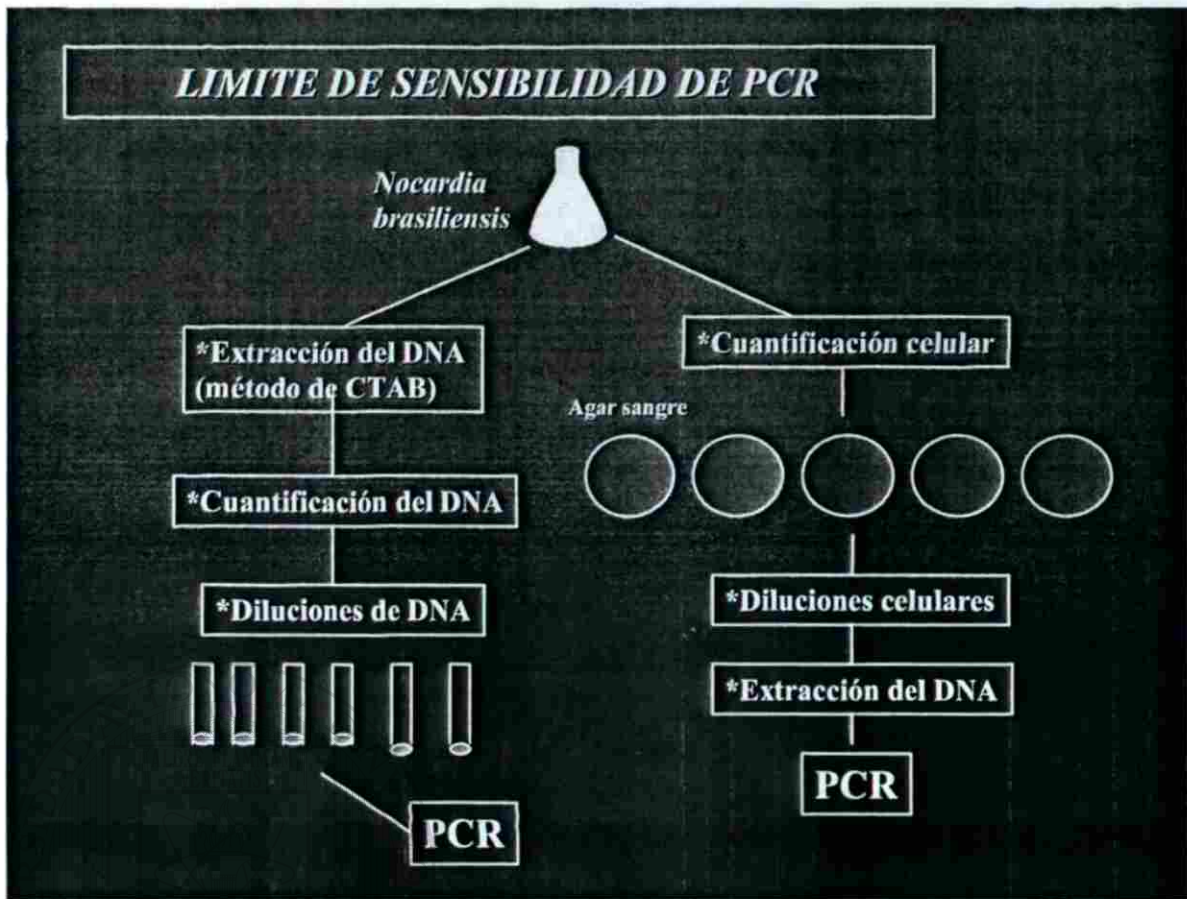
Después de este tiempo, se transfirió 1 mL del sobrenadante a un tubo conteniendo 9 mL de agua (dilución 1:10) y así se realizaron mas diluciones sucesivamente. De los tubos con cada dilución se pasaron 0.1 mL de muestra a cajas con agar Sangre para determinar la concentración celular del tubo original que fue guardado en refrigeración a 4 ° C hasta que se determinó su concentración. Se realizó siembra por triplicado de cada una de las diluciones. Las muestras se extendieron en toda la superficie de las placas con una varilla de vidrio en forma de "L" y girando las placas 6



veces. Estas placas se incubaron de 3 a 4 días a una temperatura de 30 °C y analizadas posteriormente para determinar concentración celular. El conteo se realizó en las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias crecidas. Este conteo se realizó en las tres repeticiones de cada dilución y se obtuvo un promedio. La concentración inicial se obtuvo de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} [\text{células inicial}] &= (\text{Número de células}) (\text{Factor de dilución}) (10) \\ &= \text{células / mL.} \end{aligned}$$

Después de determinar la concentración, se realizaron una serie de diluciones a partir del tubo inicial para posteriormente llevar a cabo extracción de DNA de cada una de los tubos. Las diluciones que se realizaron fueron las siguientes:  $1 \times 10^6$  células,  $5 \times 10^5$  células,  $1 \times 10^5$  células,  $5 \times 10^4$  células,  $1 \times 10^4$  células,  $5 \times 10^3$  células, 1000 células, 500 células, 100 células, 50 células, 10 células, 5 células, 2 células y 1 célula. De estas diluciones se procedió a realizar extracción del DNA utilizando la técnica descrita anteriormente (Método de CTAB) para posteriormente realizar PCR utilizando los iniciadores NB10-NB11 así como los iniciadores NOC3-NOC4.



**FIGURA 6.-**Limite de sensibilidad del método de PCR utilizado para la detección del fragmento NB10-NB11 a partir de diluciones de células y diluciones de DNA. ®

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados se sembraron en botellas con agar Sabouraud y se colocaron en incubación a 30 °C por un tiempo que varió entre los 3 y los 10 días. Después de este tiempo se realizó estudios de las características microscópicas de las colonias. En el estudio microscópico se observó la morfología típica de los actinomicetos que presentan una apariencia similar a los hongos con ramificaciones de hifas.

### 4.2 Extracción del DNA con CTAB

Las muestras de DNA que se obtuvieron por precipitación con CTAB fueron lavados con etanol al 70 % y se les agregaron 200 µL de agua miliQ estéril. Se pusieron en refrigeración a 4 °C por un tiempo de 48-72 horas para disolver el DNA. Posteriormente, las muestras de DNA fueron examinadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para determinar su calidad. Se observó que algunos DNA presentaban una alta degradación por lo que se procedió a repetir algunas extracciones de DNA. Las muestras que no presentaban degradación fueron almacenados a 4 °C hasta su utilización en ensayos de PCR o de digestión enzimática.

Los DNA fueron cuantificados por medio del método espectrofotométrico con Luz Ultravioleta y las concentraciones variaron desde los 200 ng/ $\mu$ L hasta los 2000 ng/ $\mu$ L.

Otro método que se utilizó para determinar la concentración de los DNA obtenidos fue el de comparación contra una serie de estándares de concentración que fueron corridos en gel de agarosa junto con los DNA de nuestros actinomicetos. Las concentraciones que se obtuvieron fueron similares a las obtenidas por el método Espectrofotométrico (Figura 7).



**FIGURA 7-** Cuantificación de DNA de especies de actinomicetos mediante el uso de estándares de concentración.



### 4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.

De todos los actinomicetos que se estudiaron por PCR se observó que en el caso de todas las cepas de *Nocardia brasiliensis* presentaron un producto de amplificación de aproximadamente 250 pb cuando se utilizaron los iniciadores NB10 y NB11 que amplifican un fragmento del gen de la catalasa de *Nocardia brasiliensis* (Figura 8). Entre las cepas positivas al fragmento estaba incluida la cepa HUJEG-1 de *Nocardia brasiliensis*.

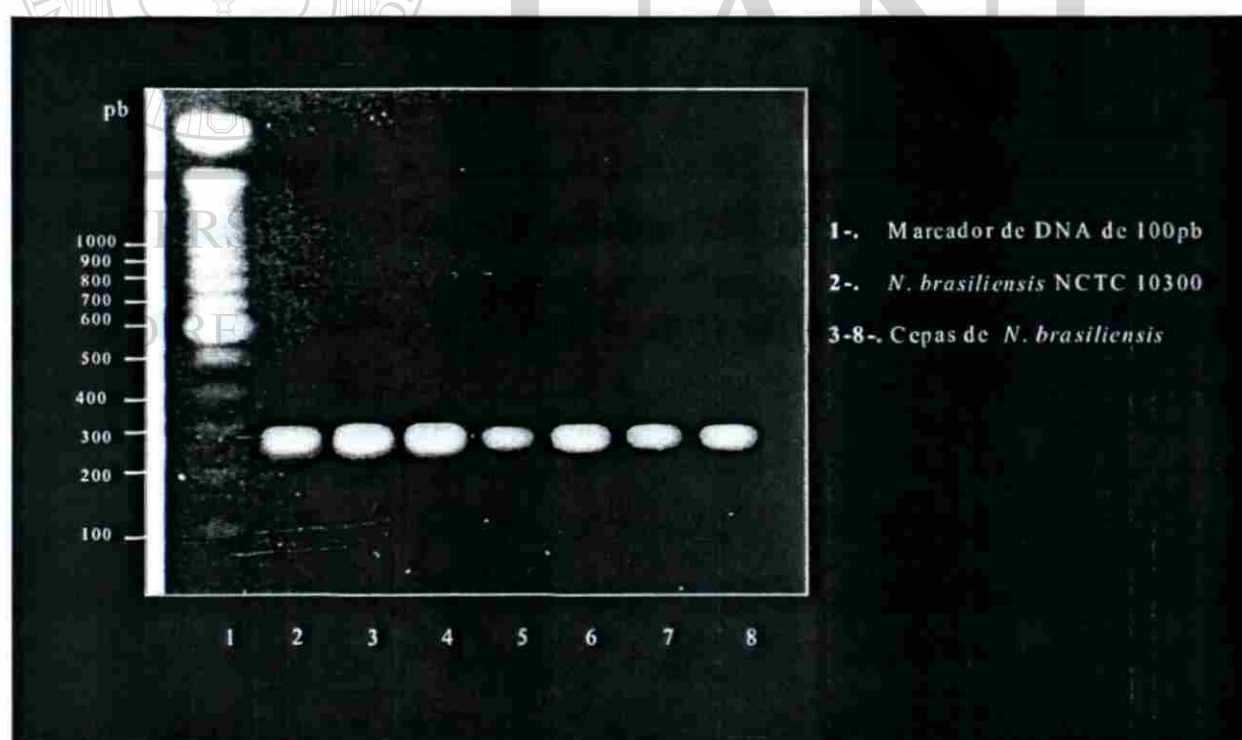
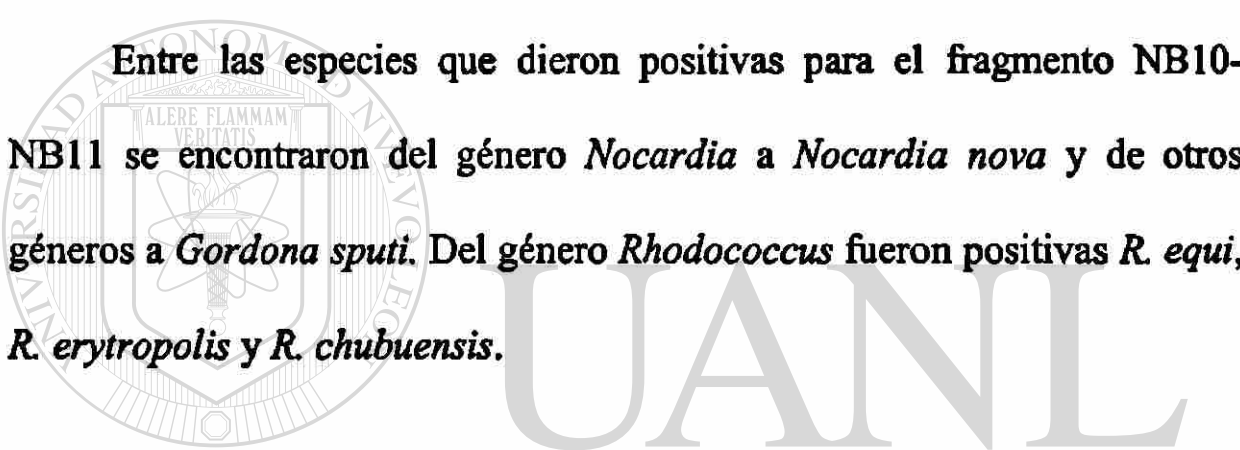


FIGURA 8-. PCR de DNA genómico de cepas de *Nocardia brasiliensis* con iniciadores NB10-NB11.

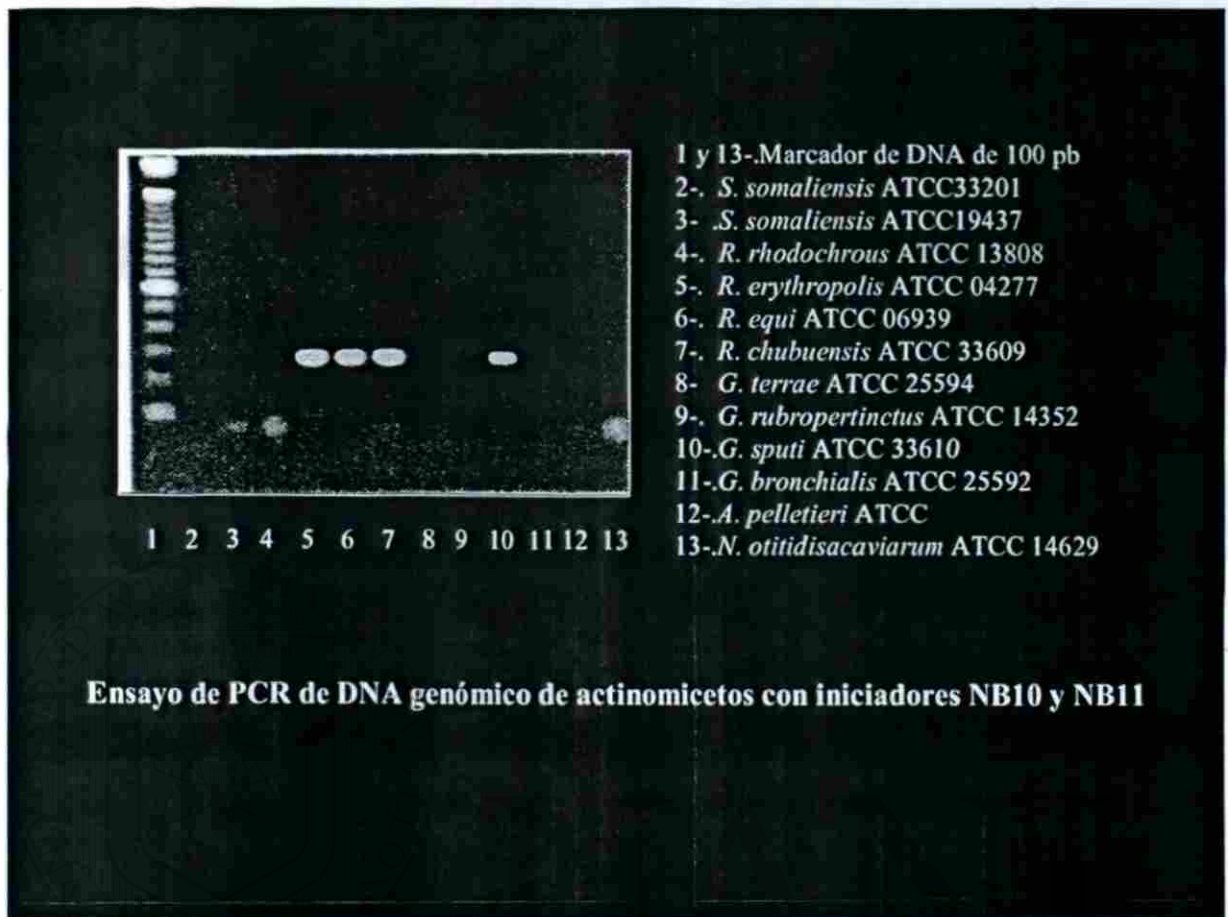
Algunas especies de actinomicetos diferentes a *Nocardia brasiliensis* presentaron este fragmento (Figura 9). Todas las especies analizadas en este estudio fueron positivas en los ensayos de PCR cuando se utilizaron los iniciadores NOC3 y NOC4 que amplificaban una región de aprox. 200 pb del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S (Resultados no mostrados).



Entre las especies que dieron positivas para el fragmento NB10-NB11 se encontraron del género *Nocardia* a *Nocardia nova* y de otros géneros a *Gordona sputi*. Del género *Rhodococcus* fueron positivas *R. equi*, *R. erytopolis* y *R. chubuensis*.

---

A todas las cepas de actinomicetos analizados se les realizó ensayos de Southern blot con el fin de determinar si dichos fragmentos eran iguales al de *Nocardia brasiliensis*.



**FIGURA 9.-** PCR de DNA genómico de actinomicetos con iniciadores NB10-NB11.

En la **Tabla 4** se enlistan los resultados obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores NB10-NB11 así como NOC3-NOC4 de diferentes especies del género *Nocardia*.



**Tabla 4-** Análisis por PCR de DNA genómico de especies de *Nocardia* con iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.

Microorganismo	NB10-NB11	NOC3-NOC4
<i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> NCTC 10300	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 1	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 5	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 7	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 8	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 13	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 22	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 31	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 32	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 33	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 38	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 48	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 51	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 53	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 54	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 81	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 84	+	+
<i>Nocardia brasiliensis</i> cepa 91	+	+
<i>Nocardia asteroides</i> NCTC 6761	-	+
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 91005	-	+
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 91352	-	+
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 930637	-	+
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 940238	-	+
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 950355	-	+
<i>Nocardia asteroides</i> LCDC 960153	-	+
<i>Nocardia brevicatena</i> ATCC 15333	-	+
<i>Nocardia carnea</i> ATCC 06847	-	+
<i>Nocardia farcinica</i> NCTC 11134	-	+
<i>Nocardia nova</i> ATCC 33726	+	+
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> NCTC 1934	-	+
<i>Nocardia transvalensis</i> ATCC 6865	-	+

+ Fragmento presente en el PCR.

- Fragmento ausente en el PCR.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados de PCR obtenidos con los demás géneros de actinomicetos analizados en este estudio. Se presentan además los resultados obtenidos con los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.

**Tabla 5-** Resultados de los ensayos de PCR con DNA genómico de otros géneros de Actinomicetos con iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.

Microorganismo	NB10-NB11	NOC3-NOC4
<i>Actinomadura madurae</i>	-	+
<i>Actinomadura madurae</i> NCTC 5654	-	+
<i>Actinomadura pelletieri</i> ATCC 33685	-	+
<i>Gordona bronchialis</i> ATCC 25582	-	+
<i>Gordona rubropertinctus</i> ATCC 14352	-	+
<i>Gordona sputi</i> ATCC 33610	+	+
<i>Gordona terrae</i> ATCC 25594	-	+
<i>Rhodococcus aichiensis</i> ATCC 33611	-	+
<i>Rhodococcus chubuensis</i> ATCC 33609	+	+
<i>Rhodococcus coprophilus</i> ATCC 29080	-	+
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	+	+
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939	+	+
<i>Rhodococcus luteus</i> ATCC 35014	-	+
<i>Rhodococcus maris</i> ATCC 35013	-	+
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 13808	-	+
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 03004	-	+
<i>Streptomyces griseus</i> NCTC 4523	-	+
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC 8664	-	+
<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> ATCC 10970	-	+
<i>Streptomyces somaliensis</i>	-	+
<i>Streptomyces somaliensis</i> ATCC 19437	-	+
<i>Streptomyces somaliensis</i> ATCC 33201	-	+
<i>Tsukamurella paurometabolum</i> ATCC 25938	-	+

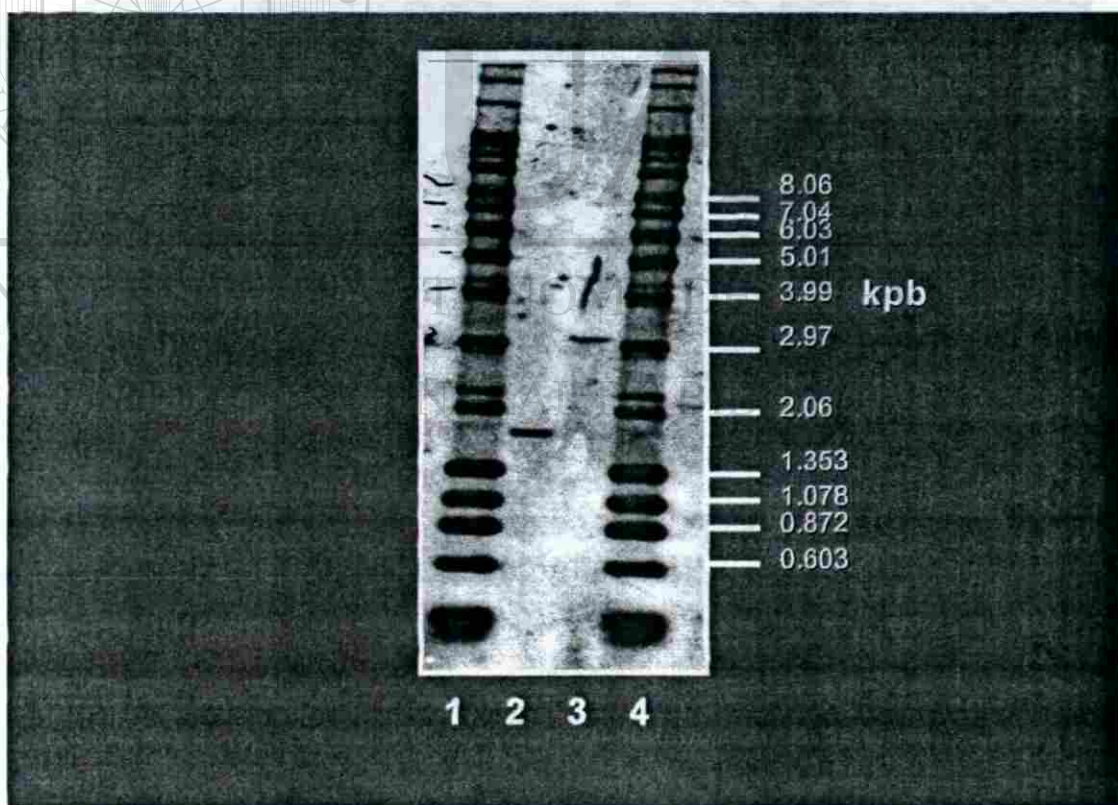
+ Fragmento presente en el PCR.

- Fragmento ausente en el PCR.



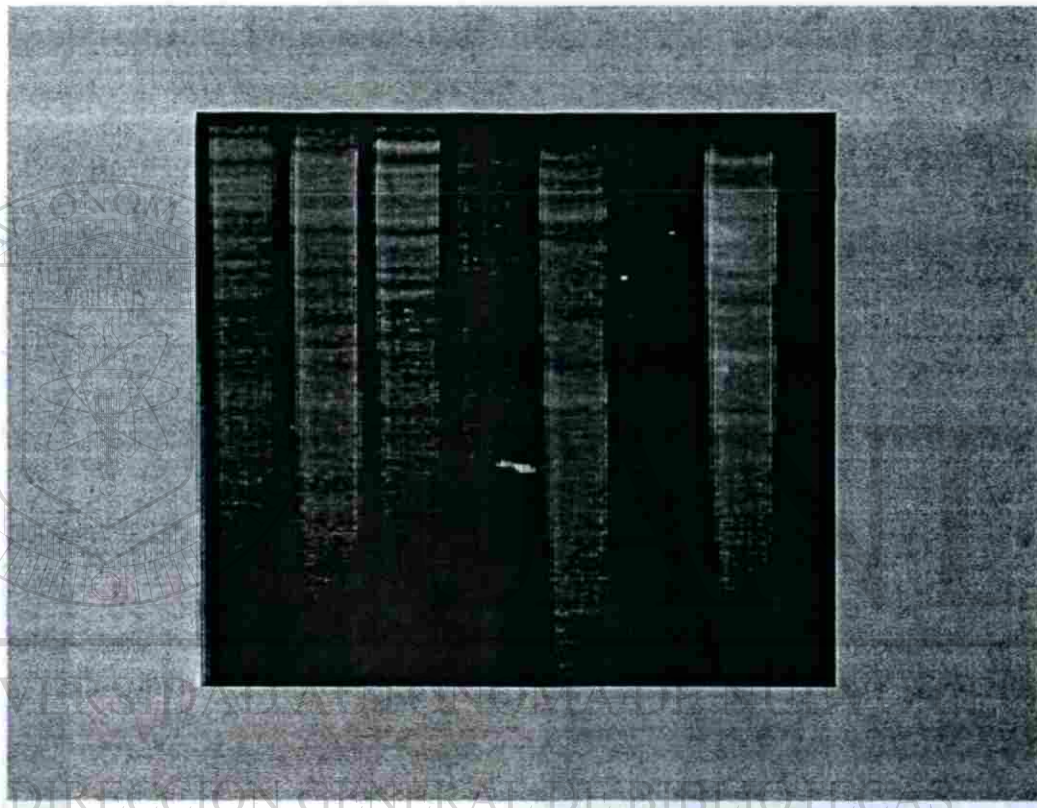
#### 4.4 Digestión Enzimática del DNA

El DNA obtenido de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Con ambas enzimas se observó que el DNA de esta cepa presentaba muchos sitios de corte al correr el DNA digerido en un gel de agarosa al 0.8 %. Cuando los DNA digeridos enzimáticamente se pusieron en contacto con la sonda NB10-NB11 marcada con Peroxidasa se observó hibridización con una banda de aproximadamente 1.7 kpb en el digerido con *Bam*HI y con una banda de aprox. 3 kpb en el caso del DNA digerido con *Eco*RI (Figura 10).



**FIGURA 10.**-Digestión enzimática de DNA genómico de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 con enzimas de restricción *Bam*HI (2) y *Eco*RI (3). Marcadores de peso molecular (1 y 4).

Se eligió *Bam*HI para digerir las muestras de DNA de las demás cepas de *Nocardia brasiliensis* así como de los otros géneros de actinomicetos debido a que se observaron muchos sitios de corte (Figura 11) a diferencia de *Eco*RI que no digería bien las muestras de DNA.



**FIGURA 11-.** DNA genómico de cepas de *Nocardia brasiliensis* digeridas con la enzima de restricción *Bam*HI.

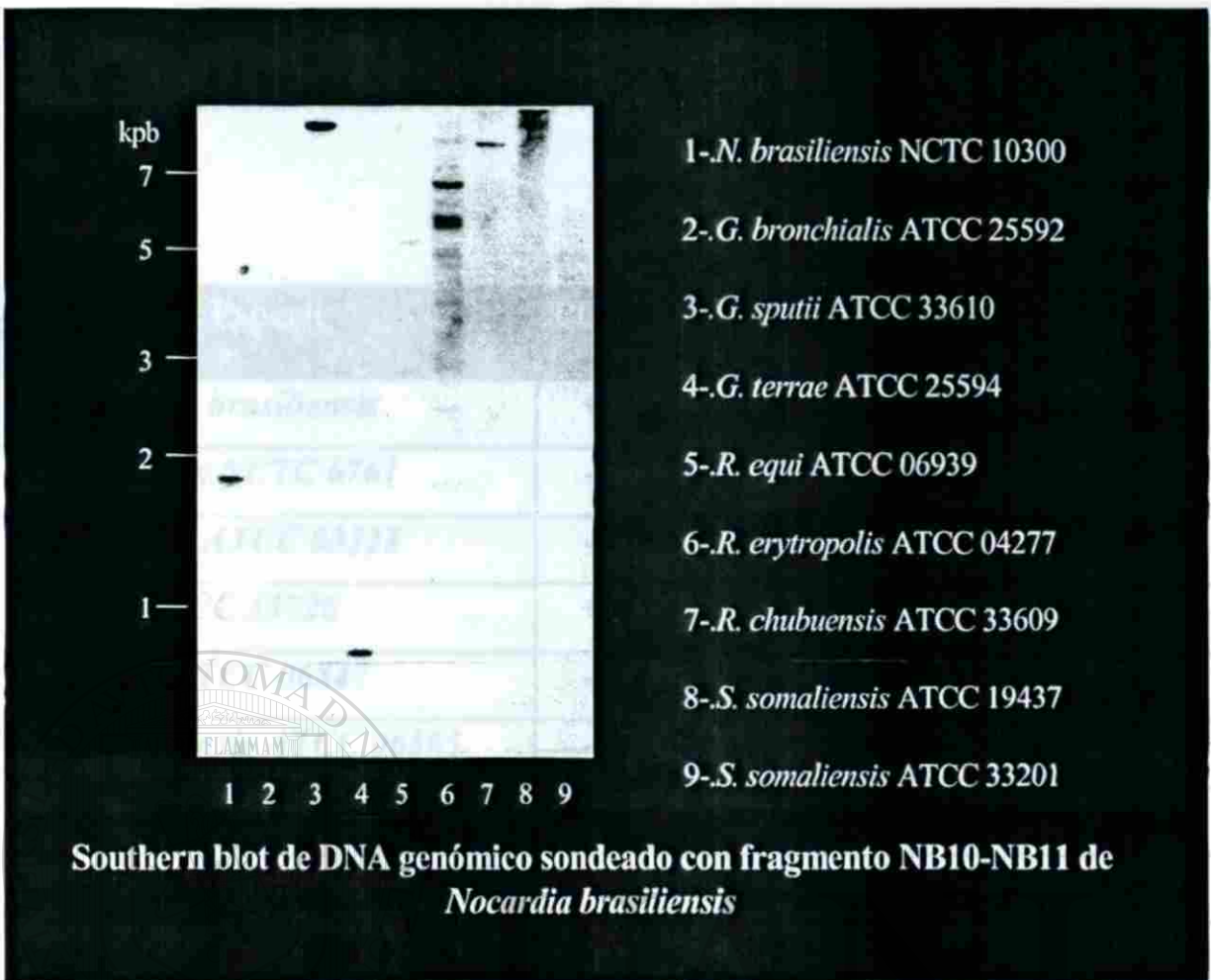
En las demás cepas de *Nocardia brasiliensis* se observó al igual que en *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 la presencia de la banda de hibridación de 1.7 kpb cuando se pusieron en contacto con la sonda NB10-NB11.



En el caso de las especies diferentes a *Nocardia brasiliensis* que fueron positivas para este fragmento en los ensayos de PCR se observó que al digerir los DNA con la enzima *Bam*HI, algunas especies dieron la presencia de bandas de hibridización con la sonda NB10-NB11 en los ensayos de Southern blot. Aunque, a diferencia de *N. brasiliensis* estas especies presentaban bandas de diferente peso molecular (Figuras 12 y 13).



**FIGURA 12-**Southern blot de DNA de actinomicetos digeridos con la enzima *Bam*HI y utilizando la sonda NB10-NB11.



**FIGURA 13.-**Southern blot de DNA de actinomicetos digeridos con la enzima *Bam*HI y utilizando la sonda NB10-NB11.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la **Tabla 6** se presentan los resultados comparativos entre los ensayos de PCR y de Southern blot para los actinomicetos examinados en este trabajo.

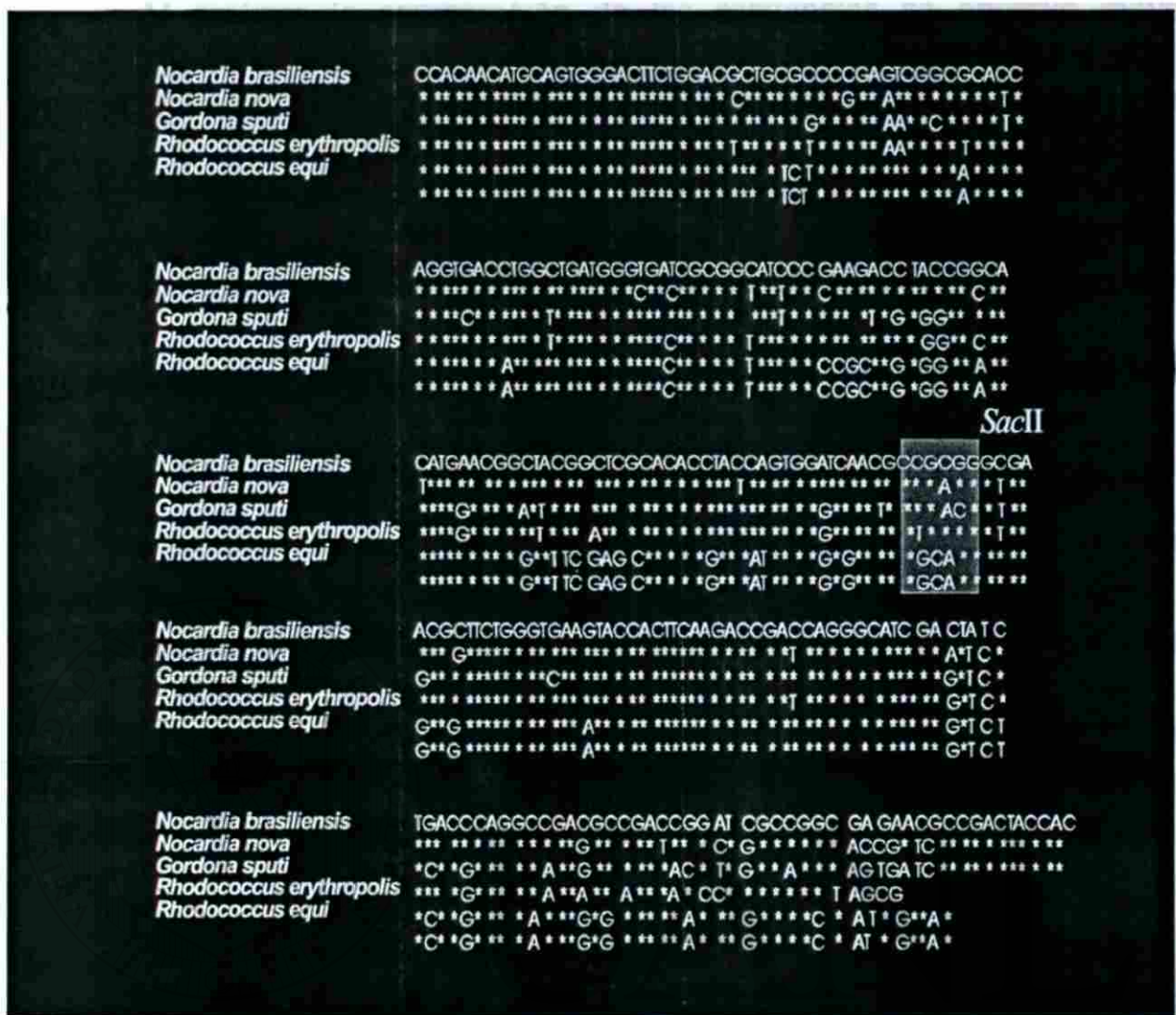
**Tabla 6.-** Resultados de Southern blot utilizando la sonda NB10-NB11 y de PCR con iniciadores NB10-NB11 de especies de Actinomicetos.

Espece	PCR	SOUTHERN BLOT	TAMAÑO DE BANDAS (kpb)
Cepas de <i>N. brasiliensis</i>	+	+	1.7
<i>N. asteroides</i> NCTC 6761	-	-	
<i>N. farcinica</i> ATCC 03318	-	+	1.5
<i>N. nova</i> ATCC 33726	+	+	1.15, 3.0
<i>N. carnea</i> ATCC 06847	-	-	
<i>N. transvalensis</i> ATCC 06865	-	-	
<i>N. brevicatena</i> ATCC 15333	-	-	
<i>N. otitidiscaviarum</i> ATCC 14629	-	-	
<i>A. pelletieri</i> ATCC 33385	-	-	
<i>A. madurae</i> ATCC 19425	-	-	
<i>S. somaliensis</i> ATCC 19437	-	-	
<i>S. somaliensis</i> ATCC 33201	-	-	
<i>R. equi</i> ATCC 06939	+	+	2.7, 5.0
<i>R. erythropolis</i> ATCC 04277	+	+	5.3, 5.5, 7.0
<i>R. chubuensis</i> ATCC 33609	+	+	9.0
<i>R. rhodochrous</i> ATCC 13808	-	-	
<i>G. bronchialis</i> ATCC 25592	-	+	1.1
<i>G. sputi</i> ATCC 33610	+	+	10
<i>G. terrae</i> ATCC 25594	-	+	0.7
<i>G. rubropertinctus</i> ATCC 14352	-	-	



#### **4.5 Análisis por secuenciación de los amplicones obtenidos con los iniciadores NB10-NB11**

De las especies que fueron positivas para el PCR con NB10 y NB11 se aislaron y purificaron los amplicones obtenidos con el Kit Wizard PCR de la forma descrita anteriormente y se secuenciaron en un Secuenciador Automático de Nucleótidos Modelo ABI 377-A con el estuche Prism-Ready basado en Ampli-Taq CS y Polimerasa (Applied Biosystems, Fostercity, California). Cada reacción de secuenciación contenía 100 ng de DNA. Una concentración de 3.2 pM, 8  $\mu$ l de Prism-Ready, Mics y todo eso fue sujeto a 25 ciclos de desnaturalización (96 °C, 30 segundos), alineamiento (50 °C, 15 segundos) y extensión (60 °C, 4 minutos). La secuenciación fue realizada por Robert Vogrig en el Federal Laboratory for Health Canada en Winnipeg, Canada. Las secuencias fueron editadas utilizando el programa Chromas y se alinearon manualmente. Este análisis de alineamiento se muestra en la **Figura 14**.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FIGURA 14-.** Secuencias nucleotídicas del fragmento NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR.

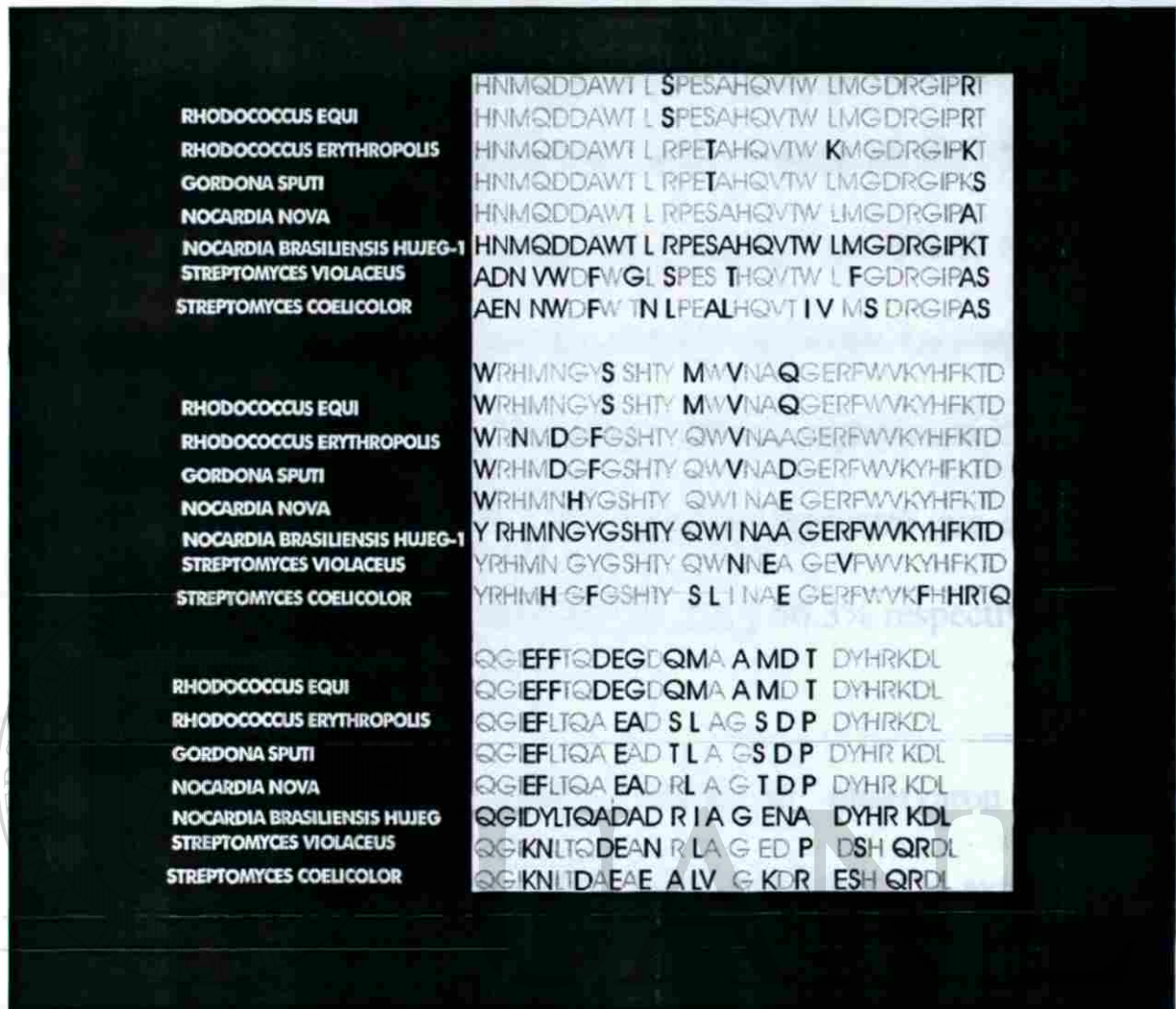
Aquí observamos que existen zonas del fragmento NB10-NB11 que están altamente conservadas como son las zonas de unión de los iniciadores NB10 y NB11. En la parte interna de la zona de alineamiento del iniciador NB11 es donde se observó la mayor variación de la secuencia nucleotídica así como en la zona central del amplicón.

Al realizar la comparación de las secuencias se observó mayor similitud entre *Nocardia brasiliensis* y *N. nova* (88.4 %). La similitud fue disminuyendo en las demás especies, teniendo una similitud con respecto a *Nocardia brasiliensis* del 86.8 % en el caso de *Rhodococcus erythropolis* y de un 83.6 % en *Gordona sputi*. La secuencia de *Rhodococcus equi* tuvo una similitud del 80 % con respecto a *Nocardia brasiliensis*.

También se observó que las secuencias de *Gordona sputi* y de *Rhodococcus erythropolis* eran muy similares entre sí. Esta similitud corresponde probablemente al grado de relación filogenética existente entre las especies mencionadas.

Al revisar la secuencia del fragmento NB10-NB11 de *Nocardia brasiliensis* se observó que existe una secuencia central que es reconocida por la enzima de restricción *SacII* y que no está presente en las otras especies que dieron positivas para el ensayo de PCR.

Después de analizar las secuencias nucleotídicas de los diferentes amplicones proseguimos a analizar si estas diferencias en la secuencia nucleotídicas afectaban en la traducción a aminoácidos (Figura 15).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FIGURA 15-** Secuencias aminoacídicas codificadas por el fragmento <sup>®</sup> NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR.

En esta figura se muestran las secuencias aminoacídicas de *Nocardia brasiliensis* y las otras especies positivas al PCR con iniciadores NB10 y NB11, en donde se observaron resultados semejantes a los obtenidos en el análisis de las secuencias nucleotídicas.



Aquí se observó que la mayor similitud observada con respecto a *N. brasiliensis* fue de un 87.3 % correspondiente a *Nocardia nova*.

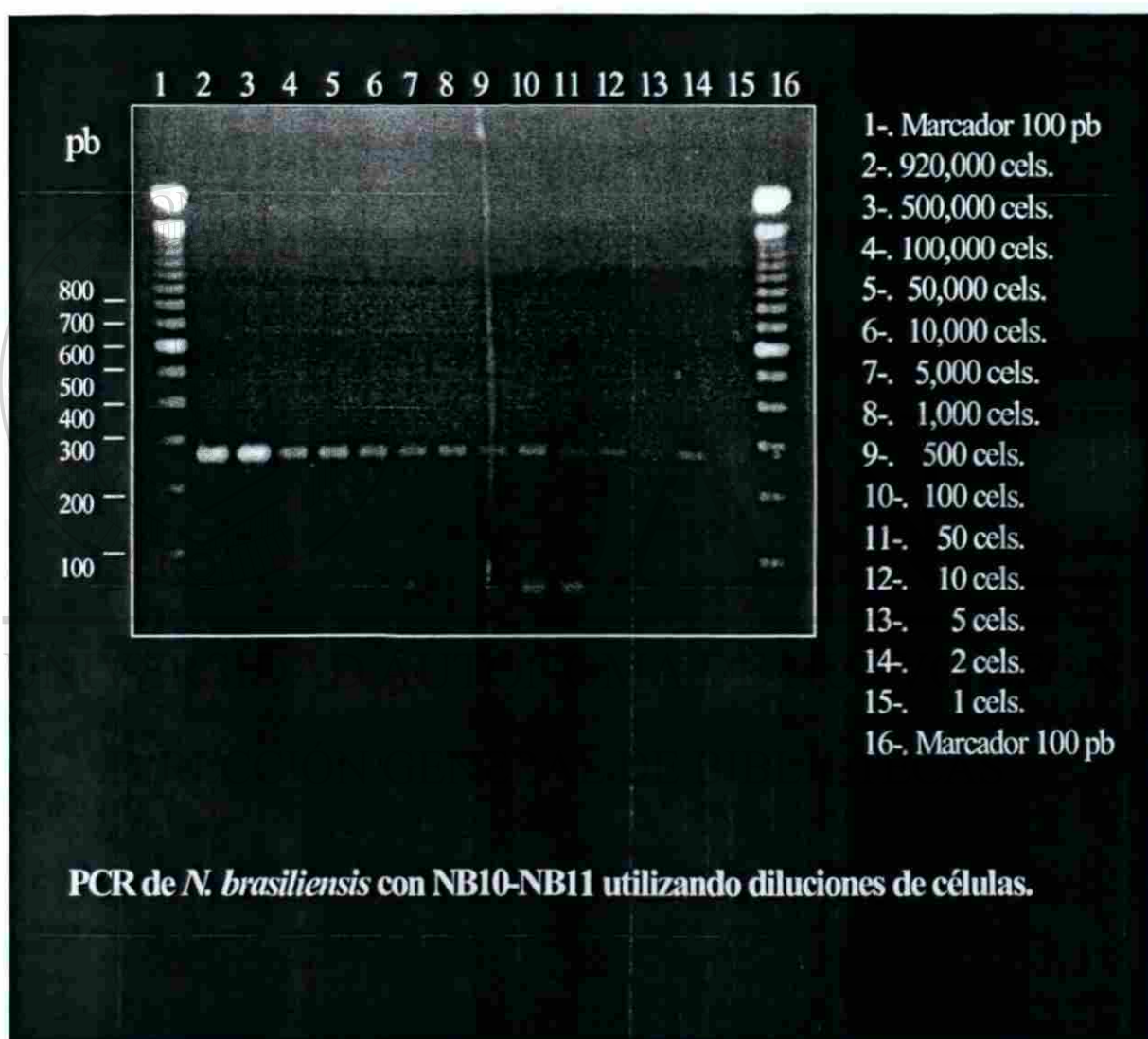
Esta similitud fue disminuyendo hasta alcanzar un 82.7 % en el caso de *Rhodococcus erythropolis* y *Gordona sputi* y de un 79.3 % en el caso de *Rhodococcus equi* con respecto a *Nocardia brasiliensis*. La comparación de la secuencia de *N. brasiliensis* con otras especies negativas al PCR como el caso de *Streptomyces violaceus* y *S. coelicolor* demostró que existe menor similitud en la secuencia aminoacídica (71.2% y 56.3% respectivamente).

En las especies positivas al PCR se observaron secuencias aminoacídicas que estaban altamente conservadas hacia el extremo amino terminal así como la zona central. La mayor zona de variación se observó hacia el extremo carboxi-terminal. Al igual que en el análisis de las secuencias nucleotídicas se observó una mayor similitud entre *Rhodococcus erythropolis* y *Gordona sputi* entre sí.

#### 4.6 Límite de Detección del PCR

Para determinar el límite de detección del método de PCR procedimos a realizar diluciones tanto de células como de DNA. En las Figuras 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos.

##### 4.6.1 Límite de detección con diluciones de células.



**FIGURA 16-** PCR de diluciones de células de *Nocardia brasiliensis* utilizando los iniciadores NB10 y NB11.

En la figura 16 se observó que en todas las diluciones que se realizaron que eran desde los 920,000 células hasta una célula se obtuvo la presencia del amplicón NB10-NB11. Este ensayo se realizó por duplicado para corroborar los resultados obtenidos y en ambos ensayos los resultados fueron los mismos además de que se utilizó una solución sin células como blanco para este ensayo.

#### 4.6.2 Límite de detección con diluciones de DNA.

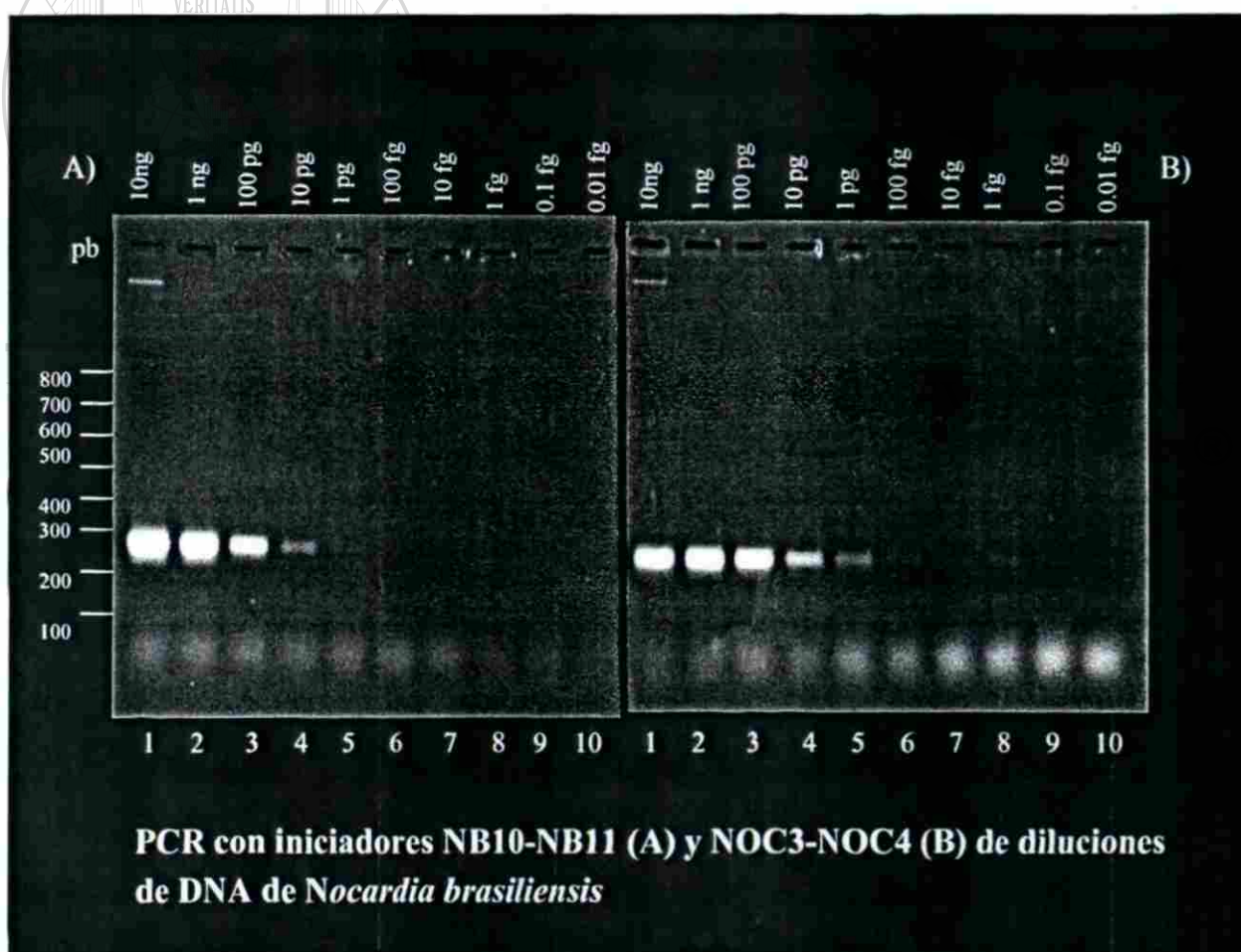
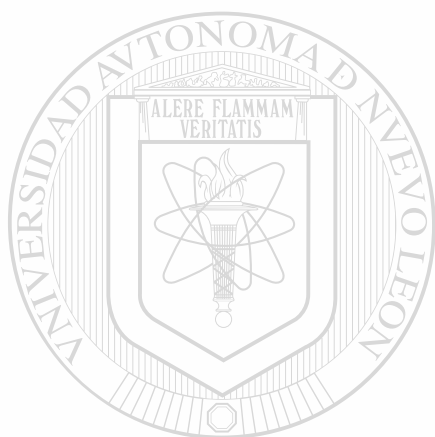


FIGURA 17-. PCR de diluciones de DNA de *Nocardia brasiliensis* utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.



En la figura 17 se aprecian las amplificaciones realizadas con los pares de iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4, en donde observamos que para los iniciadores NB10-NB11 la amplificación del fragmento se obtuvo hasta una concentración de 1 pg de DNA y para los iniciadores NOC3-NOC4 se amplificó un fragmento hasta una concentración 10 veces menor (100 fg de DNA).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 5. DISCUSION

En este estudio se seleccionó P61 para su análisis debido a que es una proteína inmunodominante que induce la formación de anticuerpos en pacientes con micetoma. Hasta ahora no se ha caracterizado prácticamente ningún antígeno proteico de *Nocardia brasiliensis* y de acuerdo a los datos de secuenciación y fisicoquímicos la proteína P61 es una enzima de tipo catalasa. Dado que las catalasas son enzimas conservadas entre diferentes géneros, en nuestro estudio determinamos si otros actinomicetos productores de micetoma comparten secuencias similares. Estudiamos también especies de actinomicetos que aunque no producen actinomicetomas, si se encuentran agrupadas junto con el género *Nocardia* en el subgrupo 1 de bacterias que contienen ácidos micólicos. Dentro de este grupo 22 (Actinomicetos Nocardioformes), de la novena edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey se incluyen los géneros *Gordona*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (34).

En primer lugar se observó en los ensayos de PCR y Southern blot que todas las cepas de *Nocardia brasiliensis* incluyendo a la cepa HUJEG-1 fueron positivas para el fragmento NB10-NB11, por lo que sospechó que este fragmento del gen de la catalasa está altamente conservado en esta especie y no presenta polimorfismo de fragmentos de longitud, al menos en

las cepas y en las condiciones de laboratorio estudiadas. En cambio, se ha observado que en otros organismos, el gen de la catalasa puede presentar variaciones e inclusive puede observarse la pérdida completa del gen lo que afecta la virulencia de algunas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* (33,67).

En nuestros ensayos de PCR utilizamos como control positivo a los iniciadores NOC3-NOC4 que amplificaban un fragmento de aproximadamente 200-pb del gen que codifica para el RNA ribosomal de 16S. Este fragmento esta altamente conservado en los actinomicetos examinados, lo que se demostró al obtener la amplificación de este fragmento en todas las especies que se les realizó el ensayo de PCR. Debemos de considerar que en el estudio se incluyeron estreptomicetos y maduromicetos y los resultados confirman la cercanía de estos microorganismos a los Nocardioformes.

Algunos microorganismos de especies diferentes al género *Nocardia* como el caso de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 04277, *R. equi* ATCC 06939, *R. chubuensis* ATCC 33609 y *G. sputi* ATCC 33610 fueron positivos para el fragmento NB10-NB11. Estos resultados concuerdan con la clasificación que incluye al género *Nocardia* junto con los géneros

*Rhodococcus*, *Gordona* y *Tsukamurella* en el grupo 22, de actinomicetos nocardioformes (34).

*Nocardia asteroides* anteriormente formaba un taxón heterogéneo con muchas posibles subvariedades (8). Recientemente este complejo ha sido dividido en 3 especies: *Nocardia asteroides* sensu stricto, *N. nova* y *N. farcinica*. Aunque estas especies pueden ser diferenciadas por su capacidad de utilizar algunas fuentes de carbono, por su crecimiento a 45 °C así como por sus diferentes patrones de ácidos micólicos o sensibilidad a antibióticos, estos métodos son lentos y frecuentemente no son definitivos (64).

En nuestros experimentos observamos resultados distintos con estas tres especies del complejo *N. asteroides*: *N. asteroides* sensu stricto fue negativa tanto para el PCR como en el Southern blot. *N. farcinica* fue negativa para el PCR pero positiva en el Southern blot, en donde se observó una banda de 1.5 kpb que hibridizó con la sonda NB10-NB11. En contraste, *N. nova* fue positiva en el PCR y en el Southern blot presentando bandas de 1.15 y 3.0 kpb.

Estos resultados concuerdan con la actividad enzimática reportada para estas especies en donde *N. asteroides* es catalasa negativa y *N. farcinica* y *N. nova* son positivas (13). Los resultados de Southern blot de *N. farcinica* y *N. nova* reflejan diferencias a nivel de nucleótidos, por lo que

también se explica el resultado negativo del PCR en *N. farcinica*. La presencia de cambios en los sitios de alineamiento de los iniciadores no permiten la formación del amplicón; sin embargo en el caso del Southern blot la sonda puede reconocer el sitio interno del fragmento (por estar conservado) y por lo tanto se obtiene una banda de hibridización en el ensayo de Southern blot. En estudios posteriores será importante determinar las secuencias completas de los genes para catalasas de *Nocardia nova* y *N. farcinica* para diseñar una prueba específica que facilite la identificación de estos microorganismos.

En los demás géneros se observó que los microorganismos que fueron positivos para el PCR con los iniciadores NB10-NB11 también fueron positivos para el Southern blot pero las bandas observadas fueron de diferente tamaño molecular. En estos géneros también se presentaron especies que siendo negativas para el PCR dieron positivas en el Southern blot. *Gordona terrae* ATCC 25594 presentó una banda de 0.7 kpb y *Gordona bronchialis* ATCC 25592 una banda de 1.1 kpb. El motivo de este cambio es quizá el mismo que para *Nocardia farcinica*, esto es, diferencias en la secuencia nucleotídica en los sitios de alineamiento de los iniciadores para PCR

En el caso de las especies que presentaban mas de una banda de hibridización, se dedujo que esto puede deberse a la presencia de varios sitios de reconocimiento para la enzima de restricción que se encuentran en la parte interna del fragmento y por lo tanto al colocar la sonda se reconocen varias bandas dentro del digerido enzimático; otra explicación puede ser la presencia de varias catalasas con secuencias similares como en el caso de *Streptomyces coelicolor* (24) o algunas Micobacterias (67).

Los resultados de Southern blot indican que estos microorganismos poseen catalasas semejantes a la de *Nocardia brasiliensis*. La cercanía filogenética se observó claramente en las especies que dieron positivas para el ensayo de PCR con los iniciadores NB10-NB11. Al compararlas y buscar el grado de homología, se observó que existe un mayor grado de homología en la secuencia nucleotídica de *Nocardia nova* con respecto a la de *Nocardia brasiliensis* (88.4 %), esto debido a que pertenecen al mismo género y poseen mas características comunes. Este grado de relación en la secuencia fue disminuyendo en el caso de las otras especies de actinomicetos que fueron positivos para el ensayo de PCR.

Las diferencias en la secuencia de aminoácidos codificados por esta secuencia de nucleótidos presentaron resultados similares al de nucleótidos

en donde se observó que la mayor similitud de la secuencia de aminoácidos de *N. brasiliensis*, la presentaba *Nocardia nova*.

Para determinar el límite de detección del método de PCR utilizado en este estudio, nosotros realizamos diluciones de células así como diluciones de DNA obtenido de *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1. En el caso de las diluciones celulares se llevó cabo el ensayo por duplicado y en todas las concentraciones celulares se obtuvo la presencia del amplicón NB10-NB11 (de 1 a 920,000 células). En este experimento se utilizó una muestra blanco libre de células para descartar una posible contaminación de células por el uso de la micropipeta, obteniéndose un resultado negativo en la amplificación con dicha muestra. En algunos reportes se han obtenido amplificaciones hasta de 0.1 UFC al utilizar un ensayo de PCR "empalmado" (42)

Al determinar el límite de detección del PCR a partir de diluciones de DNA, nosotros utilizamos los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4. En este experimento observamos que el método de PCR era mas afín para el par de iniciadores NOC3-NOC4, ya que se amplificó una banda hasta una concentración de 100 fg de DNA a diferencia de los iniciadores NB10-NB11 que amplificaron una banda a una concentración 10 veces mayor (1



pg de DNA). Estos resultados son aproximados a los reportados por Miyazaki (42) al utilizar diluciones de DNA obtenidos de *Mycobacterium tuberculosis*, en donde logró una amplificación hasta los 10 fg de DNA en un PCR "empalmado".

Las catalasas de diferentes microorganismos poseen un amplio rango en el tamaño de sus subunidades, una variedad de estructuras cuaternarias y al menos dos grupos prostéticos, además de diferencias en la secuencia aminoacídica (39). En base a la diversidad en la función y en la secuencia, las catalasas se dividen en 3 grupos principales:

1) Las Catalasas Monofuncionales, que son producidas por muchas bacterias, plantas, hongos y animales. Este tipo de catalasa poseen una actividad de peroxidasa débil y se subdividen en base al tamaño de la subunidad en catalasas con subunidades pequeñas (55 a 69 kDa) y con subunidades grandes (75 a 84 kDa). Las catalasas monofuncionales se encuentran principalmente en forma de tetrámeros pero también existen dímeros y hexámeros, además de estructuras inusuales de heterotrímeros. De acuerdo al peso molecular y a la secuencia nucleotídica, la P61 de *Nocardia brasiliensis* pertenece a este grupo de catalasas monofuncionales con subunidad pequeña. Las catalasas monofuncionales comparten una

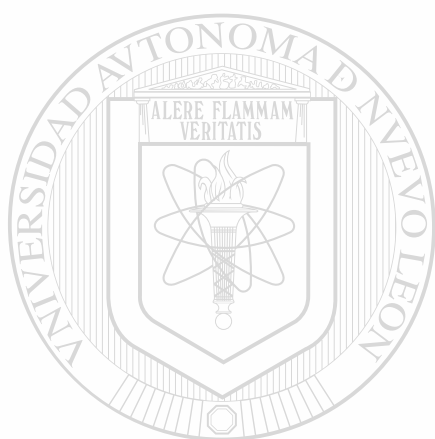
estructura central en forma de barril  $\beta$  que contiene al grupo hemo. El acceso al grupo hemo es por medio de canales angostos que limitan la entrada a moléculas pequeñas, explicando en parte, la débil actividad de peroxidasa entre estas catalasas. Las catalasas poseen un alto índice de conversión, lo que sugiere la presencia de rutas de entrada y salida independientes que previenen la interferencia entre el  $H_2O_2$  entrante y el  $O_2$  que se libera.

2) Las Catalasas-Peroxidasas que están presentes solo en bacterias y hongos. Son parecidas a las peroxidases de plantas y hongos en secuencia pero poseen subunidades mas grandes (aprox. 80 kDa).

3) Las Catalasas sin grupo hemo. Existen solo 3 enzimas de diferentes especies de bacterias. En estas enzimas la actividad es derivada de un centro de reacción rico en manganeso por lo que se les denomina "pseudocatalasas".

Las catalasas juegan un papel muy importante en la virulencia bacteriana principalmente por combatir el "estallido oxidativo" de los fagocitos humanos en los cuales una NADPH oxidasa genera grandes cantidades del ion superóxido ( $O_2^-$ ). El bajo pH dentro del fagolisosoma convierte el  $O_2$  en  $H_2O_2$  que es letal para las bacterias que carecen de catalasa (39). En *N. brasiliensis* se desconoce mucho sobre los factores

presentes en el microorganismo que favorecen la infección. La clonación del gen para P61 y la producción en células de *Nocardia brasiliensis*  $\Delta katN$  permitirá determinar si esta enzima es importante para evadir este sistema de defensa.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 6. CONCLUSIONES

1. El fragmento NB10-NB11 del gen de la catalasa está altamente conservado en las cepas de *Nocardia brasiliensis*.
2. En algunos actinomicetos de los géneros *Gordona* y *Rhodococcus* existen secuencias similares al fragmento NB10-NB11. Esto se confirmó mediante ensayos de Southern blot en donde las especies que fueron positivas al fragmento NB10-NB11 presentaron bandas de hibridización a la sonda NB10-NB11 pero de diferente tamaño molecular.
3. El fragmento NB10-NB11 está presente en especies del género *Nocardia* que están muy relacionadas a *Nocardia brasiliensis*, como es el caso de *Nocardia farcinica* y *Nocardia nova*.
4. El límite de detección del PCR utilizado fue de 1 pg de DNA utilizando los iniciadores NB10-NB11 y de 2 células realizando diluciones de una suspensión celular con el mismo grupo de iniciadores, por lo que se concluye que el método de PCR es muy eficiente en la detección de este fragmento y que será muy útil su aplicación en muestra clínicas.

## 7. LITERATURA CITADA

1.-*Alshamaony L., Goodfellow M., Minniikin D.E.* 1976. Free mycolic acids as a criteria in the classification of *Nocardia* and the rhodochrous complex. *J. Gen. Microbiol.* 92:188-199.

2.-*Alteras I., Abraham D., Ideses C., Segal R., Sandbank M.* 1988. Mycetoma of the forearm due to *Actinomadura madurae*. *Mycopathologia* 103:55-57.

3.-*Baily G.G., Neil G.P., Robertson V.J.* 1988. Nocardiosis: a neglected chronic lung disease in Africa? *Thorax* 43:905-910.

4.-*Battig U., Wegmann P., Meyer B., Penseyres J.H.* 1990. *Nocardia* mastitis in cattle. 1. Clinical observations and diagnosis in 7 particular cases. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 132:315-322.

5.-*Beaman B.L., Burnside J., Edwards B., Causey W.* 1976. Nocardial infections in the United States, 1972-1974. *J. Infect. Dis.* 134:286-296.

6.-*Beaman B.L.* 1984. Mechanism of pathogenesis and host resistance to *Nocardia*. In *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Eds, L. Ortiz-Ortiz, L.F. Bojalil and V. Yakoleff. Orlando, F.L.:Academic, pp. 73-87.

7.-**Beaman B.L.**, Boiron P., Beaman L., Brownell G.H., Schaal K., Gombert M.E. 1992. *Nocardia* and nocardiosis. J. Med. Vet. Mycol. 30:317-331.

8.-**Beaman B.L.** and Beaman L. 1994. *Nocardia* species:host parasite relationships. Clin. Microbiol. Rev. 7:213-264.

9.-**Berd D.** 1973. *Nocardia asteroides*. A taxonomic study with clinical correlations. Am. Rev. Respir. Dis. 108:909-917.

10.-**Bergeron J.R.**, Mullins J.F., Ajello L. 1969. Mycetoma caused by *Nocardia pelletieri* in the United States. Arch. Dermatol. 99:564-566.

11.-**Berkey P.**, Moore D., Rolston K. 1988. In vitro susceptibilities of *Nocardia* species to newer antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 32:1078-1079.

12.-**Boiron P.**, Provost F. 1988. In vitro susceptibility testing of *Nocardia* spp. and its taxonomic implications. J. Antimicrob. Chemother. 22:623-629.

13.-**Boiron P.**, Provost F., Dupont B. 1993. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose, p. 24-32. Institut Pasteur, Paris, France.

14.-**Bonifaz A.** 1990. Micología Médica Básica. Editorial Méndez Cervantes. Primera Edición. p. 135-160.



15.-**Borelli D.**, Middelveen. 1986. Actinomycetoma caused by *Streptomyces somaliensis*. Arch. Dermatol. 122:1097-1098 (Letter).

16.-**Bowden G.H.**, Goodfellow M. 1990. The actinomycetes: *Actinomyces*, *Nocardia* and related genera, p. 31-57. In M.T. Parker and B.I. Duerden (ed.), Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 8<sup>th</sup> ed., 4. Edward Arnold, London.

17.-**Brown J.**, McNeil M., Greer P., Lasker B., Bluth R., Schaffner W., Oblack D., Jahre J., Zaki S. 1991. Detection of *Rhodococcus equi* in tissues of HIV-infected patients by *in situ* hybridization using a biotinylated probe, abstr. D-26, p. 82. Abstr. 91<sup>st</sup> Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1991. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

18.-**Butler W.R.**, Ahearn D.G., Kilburn J.O. 1986. High performance liquid chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol. 23:182-185.

19.-**Butler W.R.**, Kilburn J.O., Kubica G.P. 1987. High performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species. J. Clin. Microbiol. 25:2126-2131.

20.-**Chun J.**, Goodfellow M. Apr. 1995. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 45, No. 2, p. 240-245.

21.-*Collins M.D.*, Pirouz M., Goodfellow M., Minnikin D.E., 1977. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J. Gen. Microbiol.* 100:221-230.

22.-*Cox F.*, Hughes W.T. 1975. Contagious and others aspects of nocardiosis in the compromised host. *Pediatrics* 55:135-138.

23.-*De Buyser M.L.*, Morvan A., Grimont F., El Solh N. 1989. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.* 135:989-999.

24.-*Goodfellow M.* Actinomycetes: *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Streptomyces* and related taxa. In J.P. Collee, J.P. Duguid, A.G. Fraser, B.P. Marmion and A. Simmons (ed.), Mackie and McCartney practical medical microbiology, 14<sup>th</sup> ed., in press. Churchill Livingstone, Edinburgh.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

25.-*Goodfellow M.* 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 69:33-80.

26.-*Goodfellow M.*, Minnikin D.E. 1981. The genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. p. 2016-2017. In M. P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel (ed.). The prokariotes: a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag KG, Berlin.

27.-*Goodfellow M.* 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:189-216.

28.-*Goodfellow M., Cross T.* 1984. Classification, p. 7-164. In M. Goodfellow, Mordarski M., Williams S.T. (ed.). *The biology of the actinomycetes.* Academic Press Inc., London.

29.-*Goodfellow M., Lechevalier M.P.* 1989. Genus *Nocardia* Trevisan 1889, 9<sup>AL</sup>, p. 2350-2361. In S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G.Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 4. The William & Wilkins Co., Baltimore.

30.-*Goodfellow M.* 1992. The family Nocardiaceae, p. 1188-1213. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, New York.

31.-*Grimont F., Grimont P.A.D.* 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur.* 137B:165-175.

32.-*Grimont F., Lefevre M., Ageron E., Grimont P.A.D.* 1989. rRNA gene restriction patterns of *Legionella* species: a molecular identification system. *Res. Microbiol.* 140:615-626.

33.-*Heym B., Alzai P.M., Honore N., Cole S.T.* Missense mutations in the catalase/peroxidase gene *katG* are associated with isoniazid

resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 1995; 15:235-245.

34.-**Holt J.G.**, Knieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. 1994. Group 22, nocardioform actinomycetes, p. 625-650. In J.G. Holt et al. (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9<sup>th</sup>. Ed Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

35.-**Kalb R.E.**, Kaplan M.H., Grossman M.E. 1985. Cutaneous nocardiosis. Case reports and review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 13:125-133.

36.-**Lechevalier H.A.**, Lechevalier M.P. 1970. A critical evaluation of the genera of Actinomycetales, p. 393-405. In H. Prauser (ed.), *The Actinomycetales*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.

37.-**Lechevalier M.P.** 1976. The taxonomy of the genus *Nocardia*: some light at the end of the tunnel?, p. 1-38. In M. Goodfellow, G.H. Brownell and J.A. Serrano (ed.), *The biology of the nocardiae*. Academic Press, Inc. New York.

38.-**Lechevalier M.P.** 1977. Lipids in bacterial taxonomy- a taxonomist's view. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:109-210.

39.-**Lowen P.G.**, Klotz M.G. and Hassett D.J. February 2000. Catalase- an "old" Enzyme that continues to surprise us. *American Society for Microbiology News*. Vol. 66. No. 2. pp. 76-82.

40.-**McNeil M.**, Brown M.J., Georghiou P.R., Allworth A.M., Blacklock Z.M. 1992. Infections due to *Nocardia transvalensis*: clinical spectrum and antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis. 15:453-463.

41.-**McNeil M.M.**, Brown J.M. July 1994. Clinical Microbiology Reviews. p. 357-417. Vol. 7, No.3.

42.-**Miyazaki Y.**, Koga H., Kohno S. and Kaku M. August 1993. Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 31, No. 8. p. 2228-2232.

43.-**Moureau P.**, Derclaye I., Gregoire D., Janssen M., Cornelis G. 1989. *Campylobacter* species identification based on polymorphism of DNA encoding rRNA. J. Clin. Microbiol. 27:1514-1517.

44.-**Neubert U.**, Schaal K.P. 1982. Sporotrichoid infection caused by *Nocardia brasiliensis*. Hautarzt 33:548-552.

45.-**Orchard V.A.**, Goodfellow M. 1980. Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil. J. Gen. Microbiol. 118:295-312.

46.-**Perolat P.**, Grimont F., Regnault B. et al. 1990. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. Res. Microbiol. 141:159-171.

47.-**Pier A.C.**, Fichtner R.E. 1981. Distribution of serotypes of *Nocardia asteroides* from animal, human, and environmental. J. Clin. Microbiol. 13:548-553.

48.-**Presant C.A.**, Wiernik P.H., Serpick A.A. 1973. Factors affecting survival in nocardiosis. Am. Rev. Respir. Dis. 108:1444-1448.

49.-**Rippon J.W.** 1988. Introduction to pathogenic actinomycetes. In Medical Mycology: The pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes, 3<sup>rd</sup>. ed. Philadelphia: WB Saunders, pp. 15-29.

50.-**Romaniuk P.J.**, Trust T.J. 1987. Identification of *Campylobacter* species by Southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16 S rRNA genes. FEMS Microbiol. Lett. 43:331-335.

51.-**Ruimy R.**, Boiron P., Boivin V., Christen R. 1994. A phylogeny of the genus *Nocardia* deduced from the analysis of small-subunit ribosomal DNA sequences, including transfer of *Nocardia amarae* to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. FEMS Microbiol. Lett. 123:261-268.

52.-**Salinas-Carmona M.C.**, Vera-Cabrera L., Welsh O., Rodríguez Q.M.A. 1992. Antibody response to *Nocardia brasiliensis* in man. Zentbl. Bakteriol. 276:390-397.



53.-*Saunders N.A.*, Harrison T.G., Kachwalla N., Taylor A.G. 1988. Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*. J. Gen. Microbiol. 134:2363-2374.

54.-*Schaal K.P.*, Lee H.J. 1992. Actinomycete infections in humans- a review. Gene 151:201-211.

55.-*Smego R.A.Jr.*, Gallis H.A. 1984. The clinical spectrum of *Nocardia brasiliensis* infection in the United States. Rev. Infect. Dis. 6:164-180.

56.-*Spehn J.*, Grosser S., Jessel A., von Essen J., Klose G. 1986. High dosage cotrimoxazole therapy of disseminated *Nocardia brasiliensis* infection. Dtsch. Med. Wochenschr. 111:215-218.

57.-*Tsukamura M.* 1982. Numerical analysis of the taxonomy of nocardiae and rhodococci. Division of *Nocardia asteroides* sensu stricto into two species and descriptions of *Nocardia paratuberculosis* sp. nov. Tsukamura (formerly the Kyoto-I-group of Tsukamura), *Nocardia nova* sp. nov. Tsukamura, *Rhodococcus aichiensis* sp. nov. Tsukamura, *Rhodococcus chubuensis* sp. nov. Tsukamura and *Rhodococcus obuensis* sp. nov. Tsukamura. Microbiol. Immunol. 26:1101-1119.

58.-*Vera-Cabrera L.*, Salinas-Carmona M.C., Welsh O., Rodriguez Q.M.A. May 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. J. Clin. Microbiol. 30:1183-1188.

59.-*Vera-Cabrera L.*, W. Johnson and M.C. Salinas-Carmona. June 1999. Amino-terminal and internal sequence analysis of the *Nocardia brasiliensis* P61 protein. *J. Clin. Microbiol.* 37:1971-1976.

60.-*Wallace R.J.Jr.*, Steele L.C., Sumter G., Smith J.M. 1988. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1776-1779.

61.-*Wallace R.J.Jr.*, Brown B.A., Tsukamura M., Brown J.M., Onyi G.O. 1991. Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. *J. Clin. Microbiol.* 29:2407-2411.

62.-*Wayne L.G.* and Díaz G.A. 1986. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 157:89-92.

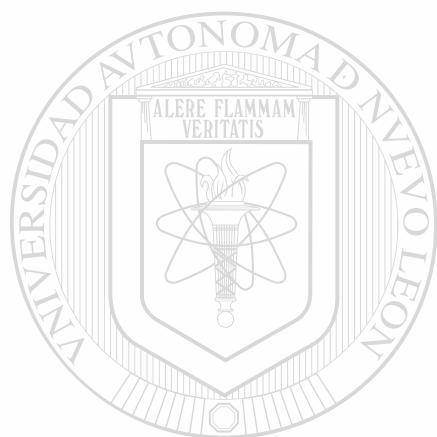
63.-*Wilson K.* 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria. p. 2.4.1-2.4.2. In F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, I.G. Seidman, J.A. Smith and K. Strohl. (ed.). *Current protocols in molecular biology*, Vol. 1. Wiley Interscience, New York. N.Y.

64.-*Workman M.R.*, Philpott-Howard J., Yates M., Beighton D., Casewell M.W. 1998. Identification and antibiotic susceptibility of *Nocardia farcinica* and *N. nova* in the UK. *J. Med. Microbiol.* 47:85-90.

65.-*Yamada Y., Inouye G., Tahara Y., Kondo K.* 1976. The menaquinone system in the classification of coryneform and nocardioform bacteria and related organisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22:203-214.

66.-*Yano I., Imaeda T., Tsukamura M.* 1990. Characterization of *Nocardia nova*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:170-174.

67.-*Zhang Y., Young D.* Strain variation in the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 1994; 14:301-308.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## APENDICE

### PREPARACION DE SOLUCIONES

#### a) Para la extracción de DNA

##### 1-Buffer TE 10 X (Tri-EDTA)

100mM Tris/HCl, pH 8.0

10 mM EDTA

Disolver en agua destilada. Esterilizar. Almacenar a temperatura ambiente.

##### 2-Lisozima 10 mg/mL

Disolver 10 mg de Lisozima en 1 mL de agua destilada. Almacenar en alícuotas de 500  $\mu$ L a temperatura de -20 °C por no mas de 1 año.

3-SDS al 10%-. Pesar 10 g. de SDS y aforar a 100 mL con agua destilada. Mantener en alícuotas de 500  $\mu$ L a -20 °C por no mas de 1 año.

4-Proteínasa K 10  $\mu$ g/ $\mu$ L-. Pesar 10 mg de Proteínasa K y agregar 1 mL de agua destilada. Mantener a -20 °C.

5-NaCl 5 M-. Pesar 29.2 g. de NaCl y aforar a 100 mL de agua destilada. Esterilizar. Almacenar a temperatura ambiente por no mas de 1 año.

**6-.Solución de CTAB/NaCl.**

Disolver 4.1 g de NaCl en 80 mL de agua destilada. Mientras se agita, se agregan 10 g de CTAB (Bromuro de Cetil, Trimetil Amonio). Si es necesario, calentar la solución a 65 °C para disolver. Aforar el volumen final a 100 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

**7-.Cloroformo:Alcohol Isoamílico, 24:1**

Mezclar 24 volúmenes de Cloroformo con 1 volumen de Alcohol Isoamílico. Almacenar a temperatura ambiente.

**8-Isopropanol.** Almacenar a temperatura ambiente.

9-Etanol al 70 %. Mezclar 70 mL de alcohol etílico concentrado con 30 mL de agua destilada.

10-Tris-HCl 2 M. Disolver 6.06 g de Tris en 17.5 mL de agua bidestilada. Ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 25 mL con agua bidestilada.

**b)Para la Electroforesis en Gel de Agarosa al 1.5%**

1-Agarosa al 1.5%. Pesar 0.39 g. de agarosa y disolver en 26 mL de buffer TAE 1X. Calentar y agitar.

2-Buffer TAE 50X. Pesar 242.2 g de Tris y disolver en 400 mL de agua bidestilada. Agregar 200 mL de EDTA 500 mM y 57.1 mL de Acido

Acético Glacial. Ajustar a pH de 8.0 y aforar a 1 litro. Esterilizar en autoclave.

3-**Buffer TAE 1X**. Tomar 2 mL de buffer TAE 50 X y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave.

4-**Buffer de carga 6X**. Mezclar 5 mL de Glicerol con 250  $\mu$ L de buffer TAE 40 X. Mezclar vigorosamente. Agregar 1 mL de Azul de bromofenol saturado y 1 mL de Xilencianol al 10 %. Agregar 2.75 mL de agua bidestilada. Almacenar a 5 °C.

**c) Para realizar las digestiones enzimáticas del DNA**

1-**Ribonucleasa A**. Pesar 10 mg de Ribonucleasa A (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) y aforar a 1 mL con agua bidestilada estéril. Separar en alícuotas de 50  $\mu$ L de enzima. Almacenar a -20 °C por no mas de 6 meses.

2-**HCl 0.25 M**. A 20 mL de Acido Clorhídrico concentrado se le agregan 980 ml de agua destilada.

3-**NaOH 0.25 M**. Pesar 10 g de NaOH y aforar a un litro en un matraz de aforación.



**d) Para la purificación de los amplicones NB10-NB11**

1-Agarosa de Bajo Punto de Fusión (LMP) al 1 %. Pesar 0.30 g de agarosa LMP y agregar 30 mL de buffer TAE 1X. Disolver con calor.

**e) Para los ensayos de Southern blot**

1-Buffer SSC 20X. Pesar 88.23 g de Citrato de Sodio. Disolver en agua bidestilada. Agregar 175 g de NaCl y agitar. Aforar a 1 litro.

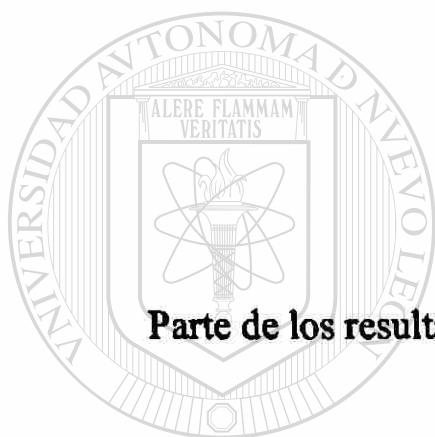
2-Buffer de Lavado Primario. Pesar 4 g de SDS. Agregar 25 mL de SSC 20 X y aforar a un litro con agua bidestilada.

3-Buffer de Lavado Secundario. Colocar 100 mL de SSC 20 X en un matraz y aforar a un litro de agua bidestilada.

**f) Para los ensayos de la determinación del Límite de Detección del método de PCR.**

1-Agar Sangre. Preparar un litro de agar bacteriológico. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 lbs/plg<sup>2</sup>. Enfriar a 55 °C y agregar sangre de carnero hasta una concentración final del 5 %.

El presente trabajo se realizó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ( Proyecto 25650-M) y del PAICYT ( Proyecto No SA87-98).



Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en :

— Vera-Cabrera, W.M. Johnson, O. Welsh, F.L. Reséndiz-Uresti, and M.C.

Salinas-Carmona. 1999. Distribution of a *Nocardia brasiliensis* catalase gene fragment in members of the genera *Nocardia*, *Gordona* and *Rhodococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1971-1976

