

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.

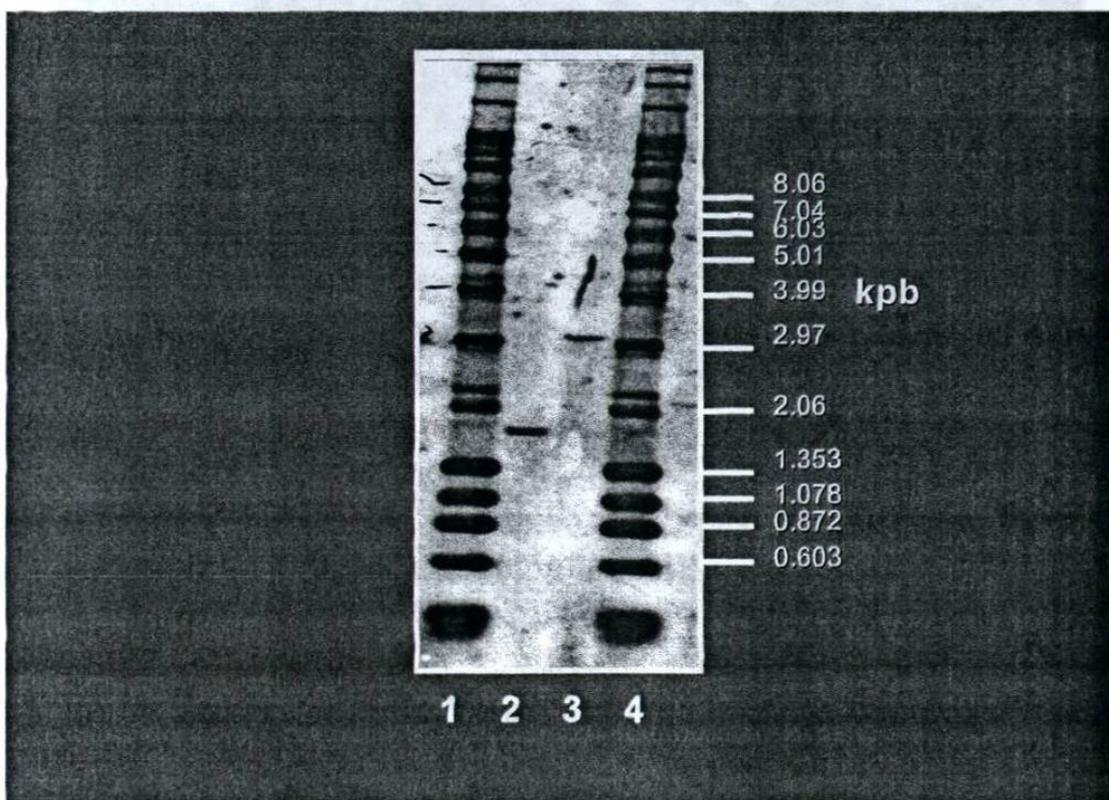
Microorganismo	NB10-NB11	NOC3-NOC4
<i>Actinomadura madurae</i>	-	+
<i>Actinomadura madurae</i> NCTC 5654	-	+
<i>Actinomadura pelletieri</i> ATCC 33685	-	+
<i>Gordona bronchialis</i> ATCC 25582	-	+
<i>Gordona rubropertinetus</i> ATCC 14352	-	+
<i>Gordona sputi</i> ATCC 33610	+	+
<i>Gordona terrae</i> 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.

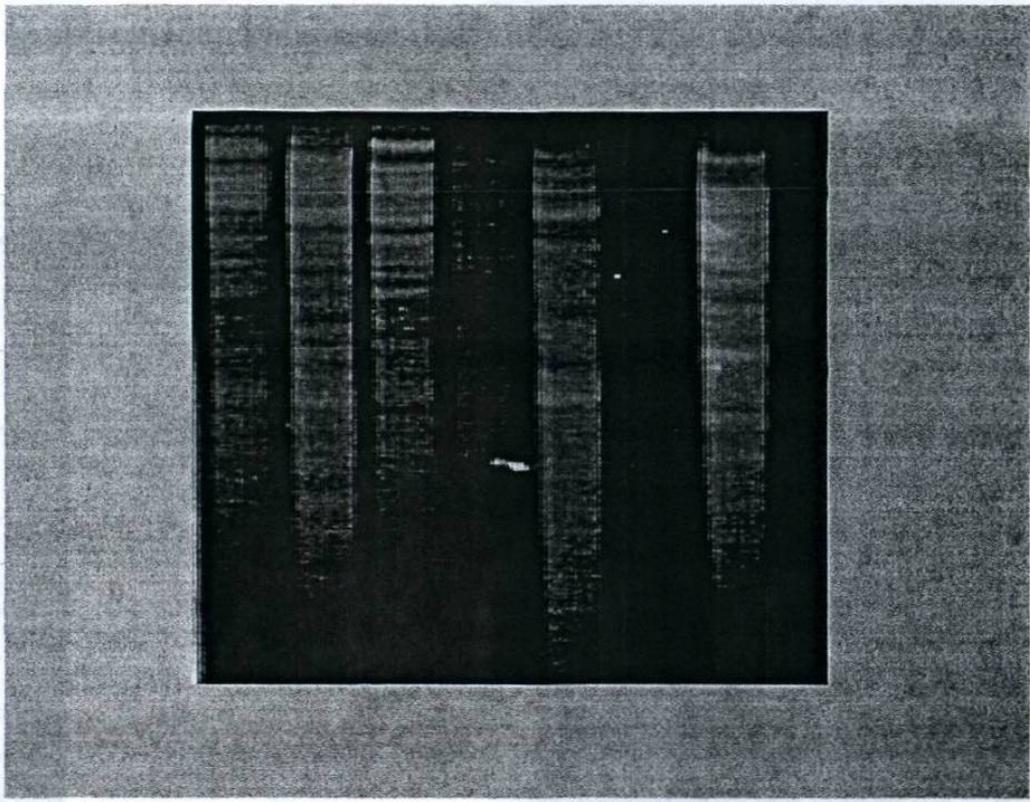
#### 4.4 Digestión Enzimática del DNA

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).

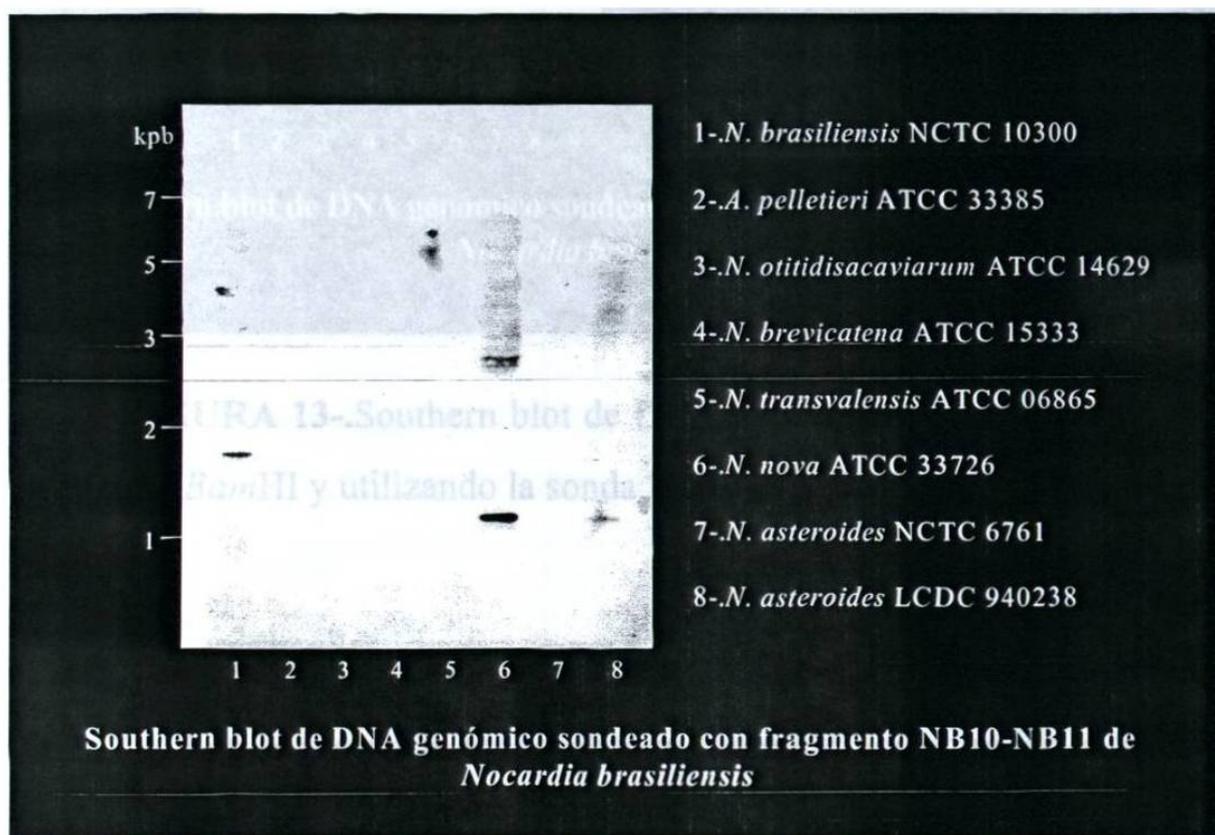
Se eligió *Bam*HI para digerir las muestras de DNA de las demás cepas de *Nocardia brasiliensis* así como de los otros géneros de actinomicetos debido a que se observaron muchos sitios de corte (Figura 11) a diferencia de *Eco*RI que no digería bien las muestras de DNA.



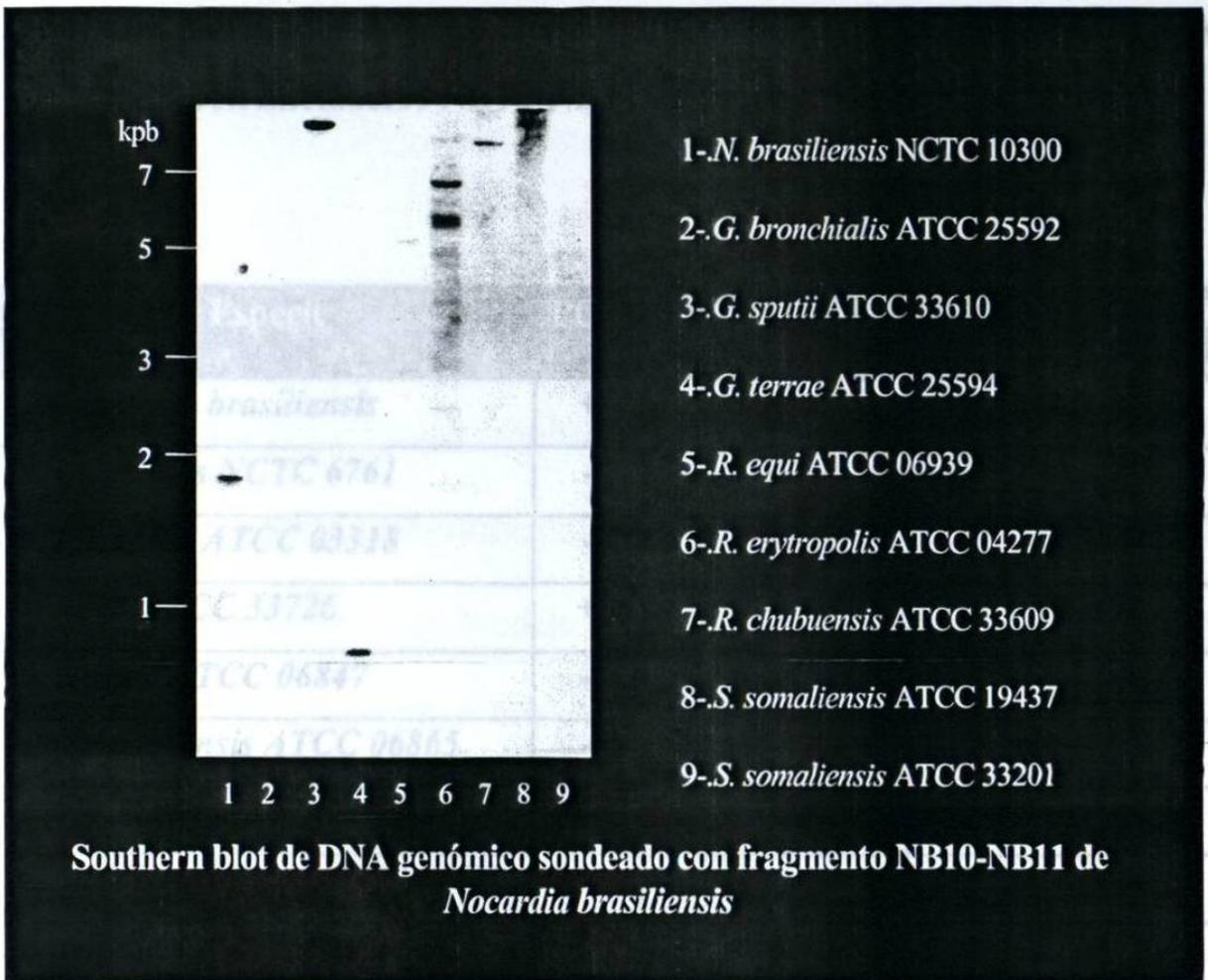
**FIGURA 11-** DNA genómico de cepas de *Nocardia brasiliensis* digeridas con la enzima de restricción *Bam*HI.

En las demás cepas de *Nocardia brasiliensis* se observó al igual que en *Nocardia brasiliensis* cepa HUJEG-1 la presencia de la banda de hibridización 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.

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 µl 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**.

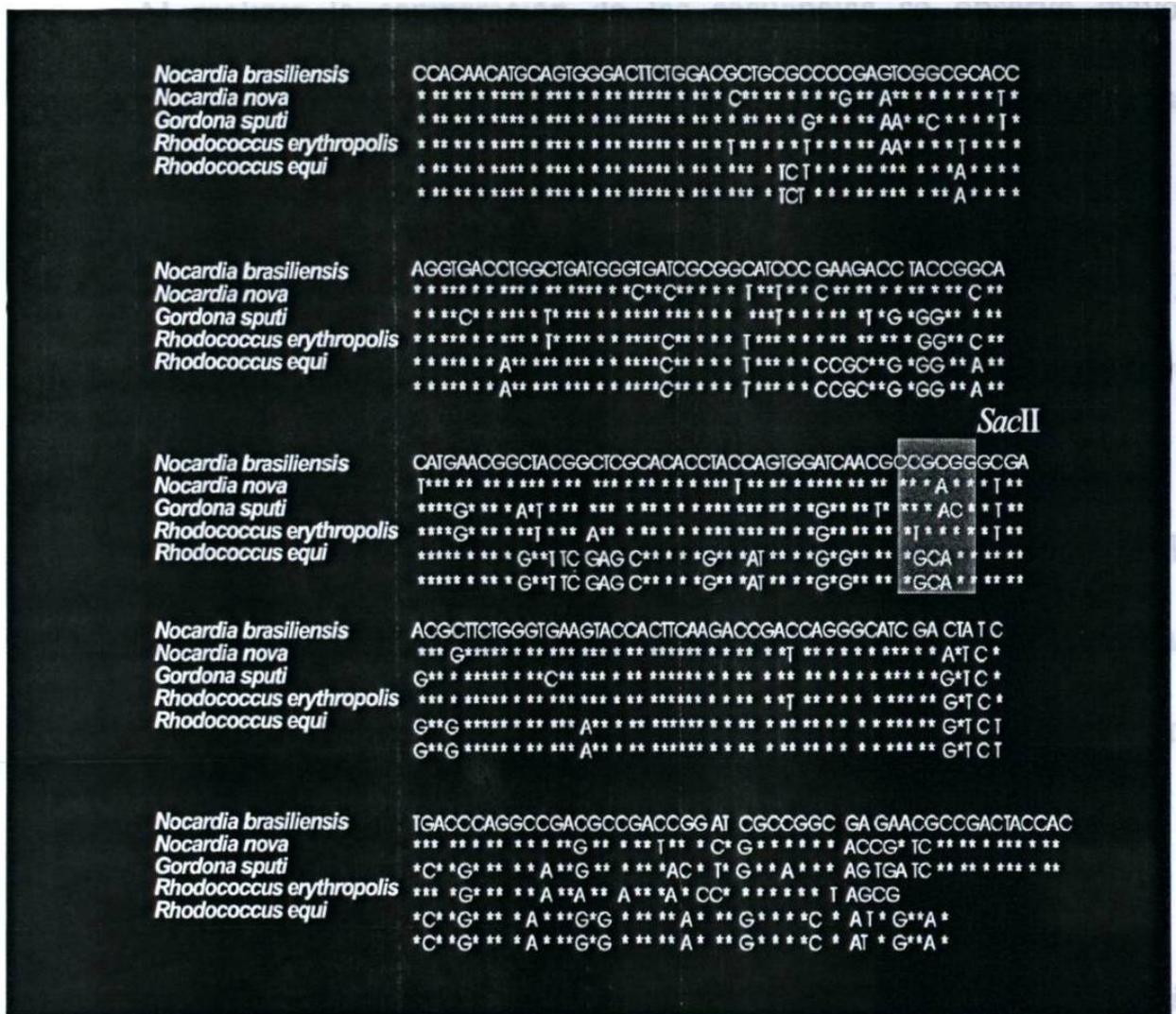


FIGURA 14-. Secuencias nucleotídicas del fragmento NB10-NB11 de actinomicetos positivos al PCR.

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 nucleotídica afectaban en la traducción a aminoácidos (Figura 15).



**FIGURA 15-.** Secuencias aminoacídicas codificadas por el fragmento 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*.

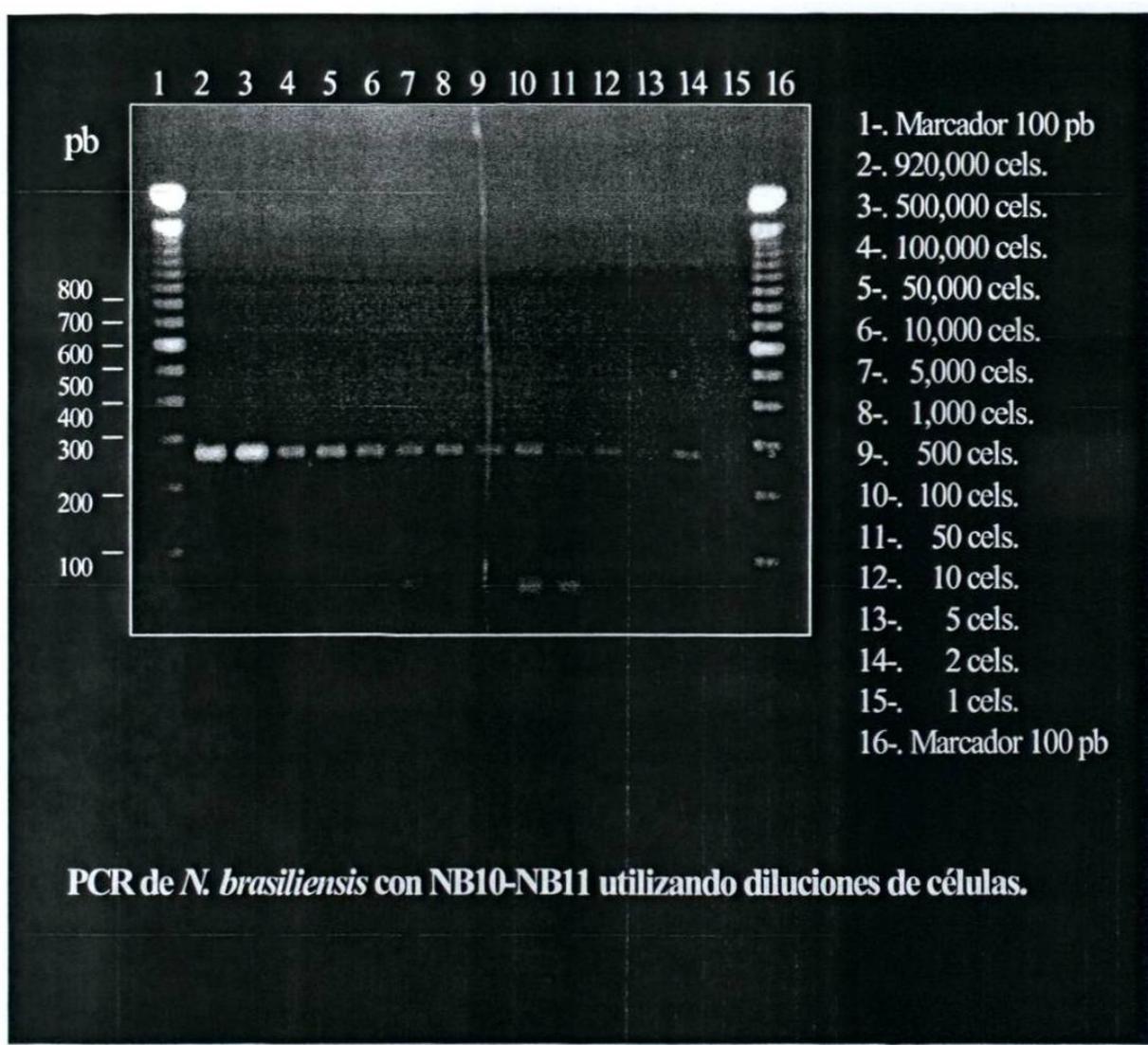
Esta similitud fue disminuyendo hasta alcanzar un 82.7 % en el caso de *Rhodococcus erythropolis* y *Gordona sputi* y de un 79.3 % en el caso de *Rhodococcus equi* con respecto a *Nocardia brasiliensis*. La comparación de la secuencia de *N. brasiliensis* con otras especies negativas al PCR como el caso 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.

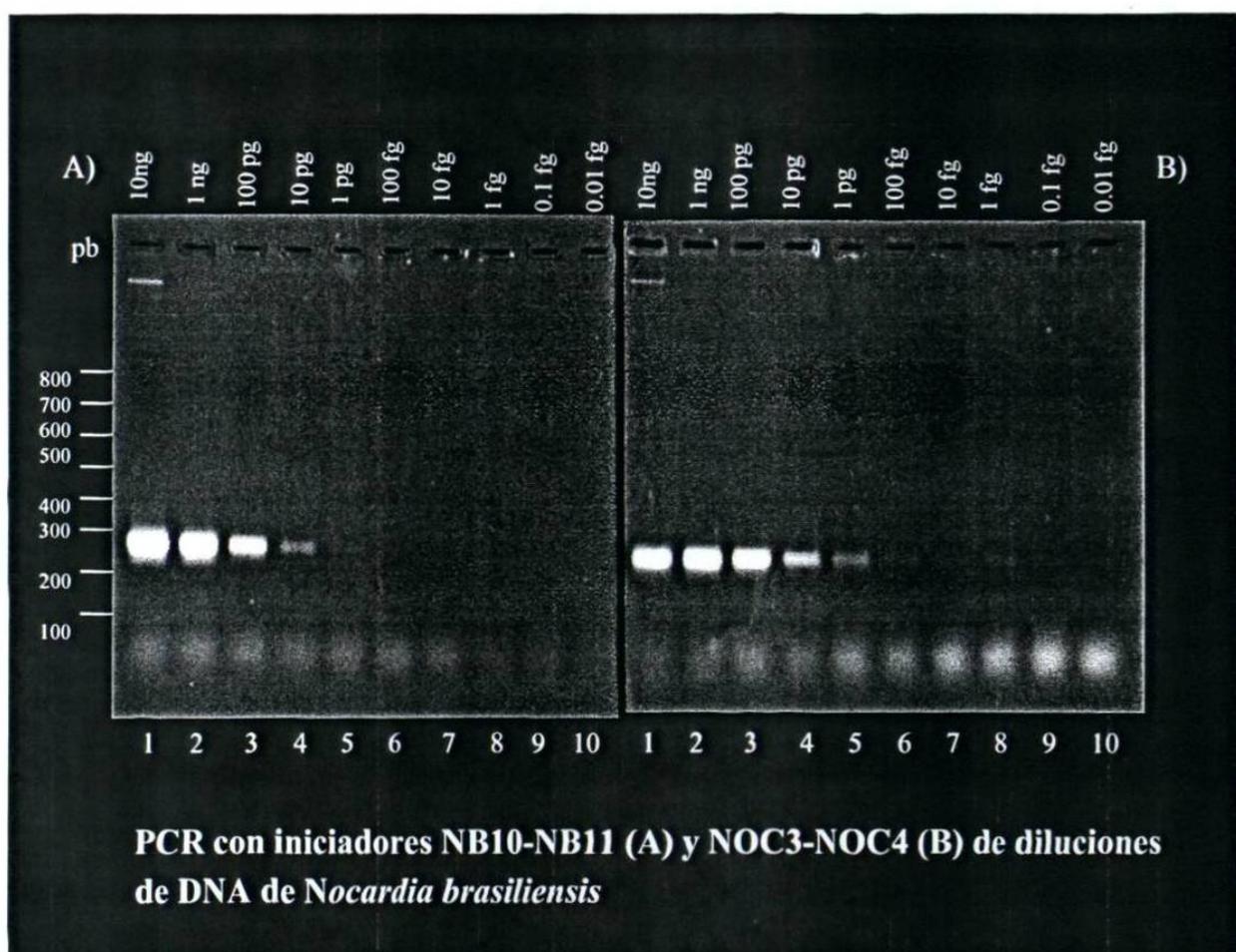


FIGURA 17-. PCR de diluciones de DNA de *Nocardia brasiliensis* utilizando los iniciadores NB10-NB11 y NOC3-NOC4.

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).

## 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  entrante y el  $\text{O}_2$  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 ( $\text{O}_2^-$ ). El bajo pH dentro del fagolisosoma convierte el  $\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  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.

## 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.
- 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. Bakteriologie. 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.

## 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

