



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**RECONSIDERACIÓN TAXONÓMICA DE ACTINOMICETOS  
AISLADOS DE SUELOS MEXICANOS**

TESIS  
(IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA  
JANETTE BERENICE GONZÁLEZ NAVA

COMITÉ DE TUTORES  
DR. HORACIO SANDOVAL TRUJILLO  
DRA. NINFA RAMÍREZ DURÁN  
M. EN C. GABRIELA S. ALONSO CARMONA

CIUDAD DE MÉXICO

OCTUBRE, 2016

“En la naturaleza, el papel de lo infinitamente  
pequeño es infinitamente grande”.

-Luis Pasteur-

## AGRADECIMIENTOS

Hace dos años comencé éste proyecto en mi vida en la Maestría de Ciencias Agropecuarias; durante el trayecto he conocido a varias personas que han sido parte importante en esto.

Agradezco enormemente a mi asesora la Dra. Ninfa Ramírez Durán por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por apoyar mi proyecto con todo lo que conlleva; le agradezco la dedicación y criterio que me ayudaron a cumplir mi trabajo; sin ella, mis objetivos no hubieran sido posibles.

Un agradecimiento especial a mi asesora la M. en C. Scarlett Alonso Carmona quien me enseñó técnicas importantes para mi proyecto, y quien al comprometerse en asesorarme siempre tuvo el tiempo, la paciencia y fue la guía que necesité durante este tiempo. También le quiero agradecer de todo corazón sus consejos y su amistad.

Quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Horacio Sandoval Trujillo, quien me ha guiado no sólo en mi proyecto de Maestría, también ha encaminado mis pasos desde hace 4 años en mi formación profesional, agradezco su tiempo y dedicación, sus consejos valiosos y sus pláticas infinitas, agradezco que sea mi maestro y mi guía, pero también, agradezco infinitamente que sea mi amigo. Sin ésta persona mi proyecto y mucho más no hubiera sido posible.

También quiero agradecer a Nora Sánchez, Marcos Sánchez y Luis Guzmán por estar conmigo en todo momento, enseñarme y apoyarme.

Un agradecimiento especial a CONACYT por su apoyo económico y a la Maestría en Ciencias Agropecuarias por su apoyo académico durante los dos años que duró mi proyecto.

*A mi madre Lety*

*Te quiero dedicar éste proyecto por haberme apoyado en todo momento, por tus consejos y valores, por la motivación constante que me ha permitido realizar mis sueños y por enseñarme a ser una persona de bien, pero más que nada, por tu amor.*

## CONTENIDO

---

I. Índice de Figuras.....	VI
II. Índice de Cuadros.....	VII
III. Índice de Gráficas.....	VIII
IV. Resumen.....	IX
1. Introducción.....	I
2. Antecedentes .....	2
2.1 Taxonomía.....	2
2.1.1 Taxonomía de actinomicetos.....	3
2.1.2 Clasificaciones biológicas.....	5
2.1.3 Diversidad microbiana.....	7
2.2 Actinomicetos.....	8
2.2.1 Los actinomicetos y las plantas.....	9
2.2.2 Los actinomicetos y los animales.....	12
2.2.3 Los actinomicetos y el hombre.....	15
2.2.4 Metabolitos producidos por los actinomicetos.....	18
2.3 Cepas de estudio.....	20
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
5. Justificación.....	23
6. Material y métodos.....	24
6.1 Diseño del estudio.....	24
6.2 Condiciones de crecimiento de las cepas.....	24
6.3 Pruebas fenotípicas.....	25
6.3.1 Análisis fenotípico.....	30
6.4 Pruebas genéticas y filogenéticas.....	32
6.4.1 Análisis filogenético.....	34
8. Discusión de resultados.....	37
9. Conclusiones.....	51
10. Anexos.....	52
10.1 Resultados de la prueba API 20E.....	53
10.2 Resultados de la prueba API 50CH.....	56
10.3 Resultados de la prueba API ZYM.....	59
10.4 Resultados de la prueba API 20NE.....	62
10.5 Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos.....	65
10.6 Artículo aceptado y en prensa.....	68
11. Referencias.....	75

## I. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infección de la papa por <i>Streptomyces</i> .....	9
Figura 2. Nódulos producidos por la asociación de <i>Frankia</i> con planta actinorrizica.....	11
Figura 3. Infección en animales.....	12
Figura 4. Lesión pulmonar por tuberculosis aguda en becerro.....	14
Figura 5. Micetoma en tórax y micetoma en pie.....	16
Figura 6. Actinomicetoma en el mundo.....	17
Figura 7. Frecuencia del actinomicetoma dependiendo de la región corporal.....	17
Figura 8. Resultados negativos y positivos de la prueba API 20E.....	27
Figura 9. Resultados negativos y positivos de la prueba API 50CH.....	27
Figura 10. Resultados positivos de la prueba API ZYM.....	28
Figura 11. Resultados negativos y positivos en la prueba API 20NE.....	29
Figura 12. Matriz de semejanza entre cepas dependiendo de su Ssm.....	31
Figura 13. Ejemplo de dendrograma.....	32
Figura 14. Microscopía de cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	39
Figura 15. Microscopía de cepas de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> .....	39
Figura 16. Crecimiento colonial de cepas de <i>Nocardia brasiliensis</i> . ....	40
Figura 17. Ejemplo de las galerías.....	41
Figura 18. Ejemplo de la prueba de sensibilidad a antibióticos.....	42
Figura 19. Dendrograma realizado con el programa NTSYS.....	43
Figura 20. Árbol filogenético de las cepas de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> . ....	47
Figura 21. Árbol filogenético de las cepas de <i>Nocardia</i> .....	48

## II. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Actinomicetos que fomentan el crecimiento de diferentes familias de plantas mediante interacción mutualista.....	10
Cuadro 2. Actinomicetos que interactúan como huéspedes en animales provocando infecciones.....	12
Cuadro 3. Simbiosis de actinomicetos en animales.....	15
Cuadro 4. Características de la colonia.....	25
Cuadro 5. Características de la célula.....	25
Cuadro 6. Matriz de datos de las pruebas bioquímicas.....	30
Cuadro 7. Resultado posible de una prueba.....	30
Cuadro 8. Identificación previa y actual de las cepas de estudio.....	45

### III. INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Número de especies de <i>Nocardia</i> , <i>Actinomadura</i> y <i>Rhodococcus</i> en los últimos años.....	5
Gráfica 2. Número de especies de <i>Streptomyces</i> .....	5
Gráfica 3. Número de especies encontradas en las cepas de estudio.....	37

#### IV. RESUMEN

Actualmente, los taxónomos deben manejar un sistema para agrupar y nombrar de forma ordenada, lógica y que sea universal para cualquier investigador en el mundo; y así, no perder de vista a todas las formas de vida conocidas.

Gracias a los avances científicos, se han establecido metodologías que facilitan el estudio de los organismos y que permite obtener mayor información acerca de ellos.

La taxonomía de los actinomicetos ha cambiado sustancialmente en las últimas décadas, incorporando nuevos métodos de identificación y criterios adicionales para la descripción de nuevas especies como se ha mencionado antes.

El conocimiento de los actinomicetos es de gran importancia, ya que éstas bacterias tienen una gran variedad de actividades, como por ejemplo, ser productores de una gran cantidad de metabolitos, entre los más importantes están los antibióticos; también pueden ser patógenos para los organismos superiores, aunque también se ha visto que pueden favorecer a otros organismos por su actividad simbiótica con ellos.

El presente estudio se llevó a cabo en 51 cepas de actinomicetos de aislados clínicos que fueron donados por el InDRE. Se utilizaron técnicas de taxonomía actuales: 130 pruebas bioquímicas automatizadas API, observación del crecimiento colonial y celular para su descripción, y la secuenciación del gen 16S del rRNA para la identificación a nivel de género y especie. Las pruebas en conjunto nos permitieron hacer una reconsideración taxonómica de las cepas de estudio, además nos permitió realizar un catálogo de referencia en donde se describe cada una de las cepas utilizadas.

La importancia de este trabajo es a nivel taxonómico en microbiología, pues permite a proyectos posteriores tener una base en el conocimiento de los actinomicetos patógenos

## 1. INTRODUCCIÓN

Una bacteria es un organismo procariote que presenta un tamaño de pocos micrómetros. Los actinomicetos o actinobacterias son un grupo de bacterias Gram positivas heterótrofas; la mayoría de éstos se encuentran en la tierra jugando un papel importante en la descomposición de materia orgánica; en el suelo son los seres más abundantes, promediando un 64% de la biomasa bacteriana (Madigan *et al.*, 2009). Otras actinobacterias habitan en las plantas, animales y personas, algunos participan como patógenos y otros como agentes benéficos.

Algunas poblaciones animales proporcionan reservorios adecuados para el crecimiento y existencia de actinomicetos patógenos, y su propagación es un proceso ecológico que depende de las propiedades biológicas del organismo causante, de las propiedades biológicas del organismo hospedero y de factores bióticos y abióticos responsables de la transmisión del patógeno entre hospederos diferentes. Se han identificado a los géneros *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Dermatophilus*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Nocardiosis* como agentes causales de enfermedades en animales (McGavin y Zachary, 2007).

Este tipo de bacterias también interactúan con el hombre provocando una infección llamada actinomicetoma. A pesar de su importancia social y como problema de salud, sobre todo en países de tercer mundo, no han sido estudiados exhaustivamente, quedando un poco alejados del interés de otros investigadores y de las instituciones de salud. Cabe señalar que los actinomicetomas son más frecuentes en campesinos y se considera a *Nocardia brasiliensis* el agente causal más frecuente en el mundo (López-Martínez *et al.*, 2013) desde hace décadas.

Los actinomicetos también degradan desde azúcares simples, proteínas, ácidos orgánicos hasta sustratos complejos, por esto son importantes en el proceso de transformación y obtención del humus en el suelo. Además algunos producen antibióticos que regulan los patógenos de las plantas, éstos crecen inhibiendo las poblaciones de los patógenos, regulando los problemas hasta alcanzar un balance que le permita a las plantas obtener nutrientes y desarrollarse. Los géneros de actinomicetos del suelo más importantes para la nutrición de las plantas son: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Frankia* y *Actinomyces* (Graham, 1982).

Los actinomicetos como agentes causales de enfermedades en plantas no son una novedad. Aunque en el pasado, la fitopatología de éstos fue restringido por problemas taxonómicos, por la falta de criterios confiables para el reconocimiento de especies, lo que llevó a una confusión en cuanto a los agentes causales. En la última década las cosas empezaron a cambiar con la aplicación de métodos para la evaluación de similitudes y diferencias recíprocas entre los diferentes microorganismos. Este enfoque ha facilitado una aclaración preliminar de los patrones que caracterizan a los actinomicetos fitopatógenos (Locci, 1994). Por su relevante interacción con otros organismos, los actinomicetos deben identificarse y clasificarse adecuadamente para un correcto diagnóstico y tratamiento; de ésta manera evitamos pérdidas de recursos vegetal, animal y humano, y aprovechamos los beneficios que éstos nos ofrecen.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 TAXONOMÍA

La taxonomía obtiene, resume y organiza información acerca de un organismo que se localizará en un esquema clasificatorio y estará denotado por un nombre en particular (Priest y Austin, 1993).

Actualmente, los taxónomos deben manejar un sistema para agrupar y nombrar de forma ordenada, lógica y que sea universal para cualquier investigador en el mundo; y así, no perder de vista a todas las formas de vida conocidas.

Un problema principal es estudiar la unidad básica de clasificación que es la "especie". En 1940, Ernst Mayr definió especie como grupos de poblaciones naturales que se cruzan real o potencialmente entre si y que han quedado aisladamente de otros grupos (Woese, 1987).

Gracias a los avances científicos, se han establecido metodologías que facilitan el estudio de los organismos y que permite obtener mayor información acerca de ellos. Un primer paso en la taxonomía es la identificación, en donde se realizan pruebas de diagnóstico específicas, pues cada género, incluso cada especie tiene diferentes reacciones cuando se les enfrenta a diferentes reactivos y esto ayuda a determinar de quién se está hablando, comparando con organismos de identidad ya conocida (Bou *et al.*, 2011). En la Fenética se utilizan aproximadamente 100 pruebas bioquímicas que representan características externas, luego toda esta información se ingresa a computadoras, luego se comparan y se ven sus posibles relaciones; mediante estudios bioquímicos se puede determinar las similitudes y diferencias entre enzimas, proteínas, hormonas, vías de reacción y de las moléculas estructurales importantes.

Hoy en día es común usar técnicas moleculares que ayudan a reflejar las relaciones filogenéticas; como carecemos de conocimiento directo del camino evolutivo, la premisa es que los organismos están relacionados por la herencia, y que la secuencia de un genoma es un registro explícito de los ancestros de dicho organismo; como la evolución es un proceso de herencia del cambio nucleotídico, analizar las diferencias en la secuenciación de ADN de distintas bacterias debe permitirnos reconstruir su historia filogenética (Madigan *et al.*, 2009). Con el desarrollo de técnicas de secuenciación de aminoácidos en las proteínas, nucleótidos de las moléculas de ADN y RNA, se han podido comparar organismos a través de los genes.

El segundo paso de la taxonomía es la clasificación dependiendo de las características obtenidas de las pruebas anteriores; para las bacterias, el sistema de clasificación aceptado es el Esquema Taxonómico de las Procariontas (Taxonomic Outline of the Prokaryotes) originado de la segunda edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Este manual ha ayudado a los microbiólogos o taxónomos desde 1923 y es un compendio de información sobre todas las especies bacterianas reconocidas.

Un tercer paso es nombrar al organismo aplicando una serie de reglas formales para nombrar a los organismos. Siguiendo el sistema binomial de nomenclatura que se emplea en toda la biología, los procariotes reciben nombres de género y adjetivo de especie. Los términos utilizados son latinos o derivados griegos latinizados, a menudo referentes a alguna característica descriptiva adecuada al organismo y se escriben en letra cursiva. Al nombrarlos, ordenamos el mundo natural, facilitando la comunicación efectiva, lo que incluye su comportamiento, ecología, fisiología, patogénesis y sus relaciones evolutivas. La asignación de nombres de bacterias y arqueas está regulada por el Código Bacteriológico (El Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana). Incluso, hay reglas para rechazar aquellos nombres erróneos en su forma original o que algún modo han quedado invalidados.

### **2.1.1 Taxonomía de los actinomicetos**

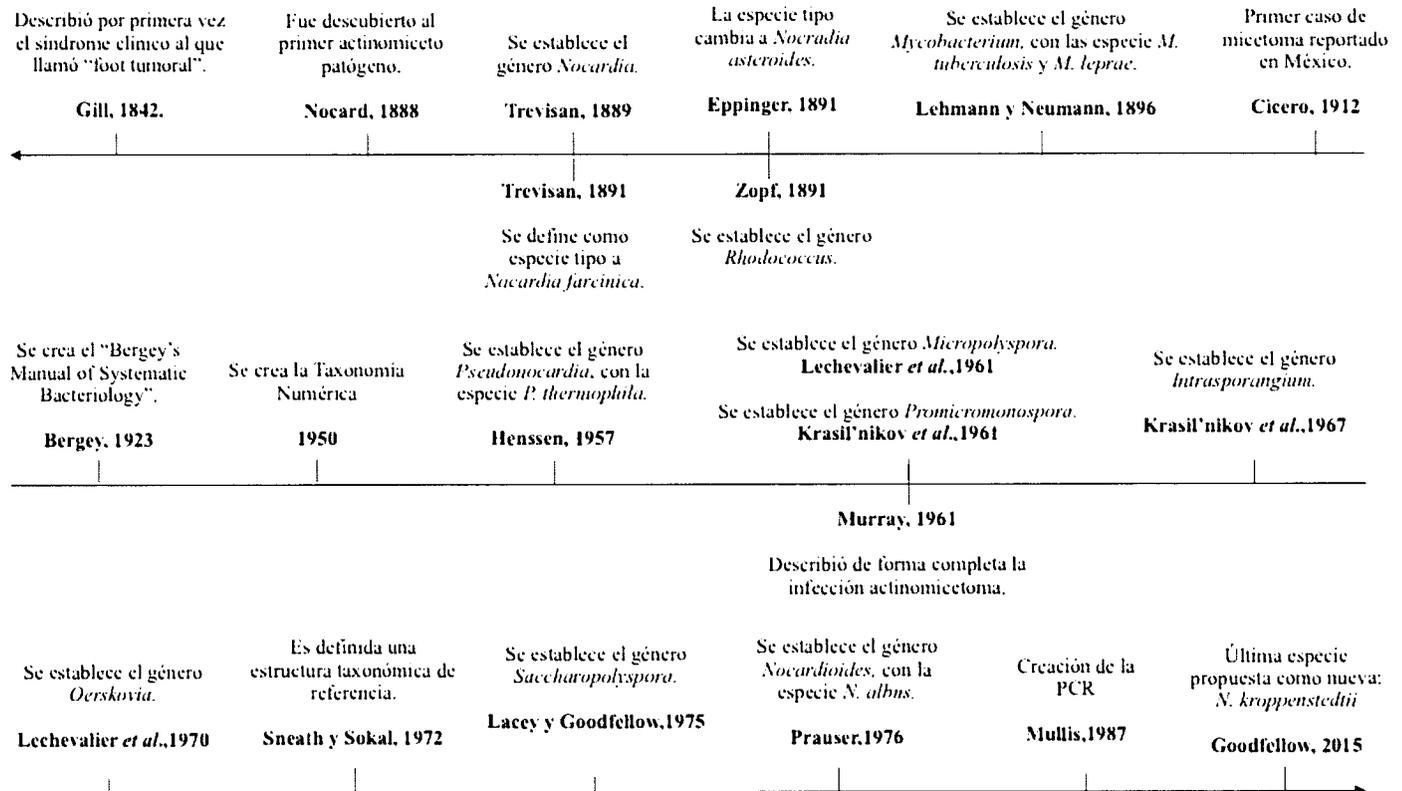
El primer actinomiceto (o actinobacteria) reconocido como patógeno fue aislado por el veterinario francés Edmund Nocard en 1888 en una epidemia de muermo bovino afectando al ganado de la isla de Guadalupe. En 1891, Eppinger reporta el primer caso de nocardiosis humana en un paciente con “síndrome pseudotuberculoso” y abscesos cerebrales generado por un microorganismo igual al descrito por Nocard anteriormente. En 1889, Trevisan crea el género *Nocardia*, con *Nocardia farcinica* como especie tipo; en 1980, Gordon y Mihm proponen, y es oficialmente aceptado el nombre de *Nocardia asteroides* para la especie tipo, reemplazando a *N. farcinica* hasta nuestros días, designando una nueva cepa (ATCC19247) como cepa tipo, en lugar de la aislada originariamente en 1888 (Beaman, 1994).

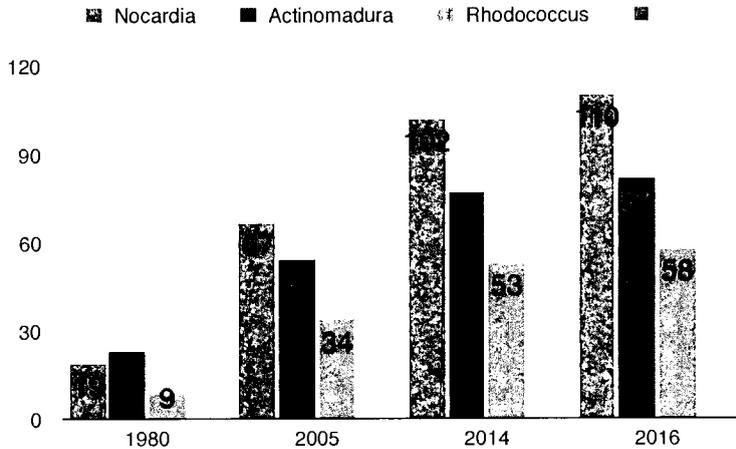
En un principio todos los actinomicetos se clasificaron como hongos debido a que su morfología y desarrollo presentaban gran similitud con éstos, y se les denominó “hongos radiados”. Posteriormente se estudiaron de manera más completa y se reconocieron como procariontes, poniéndolos en la clasificación de bacterias. (Koncman, 2001; Prescott, 2002).

Los actinomicetos resultan difíciles de aislar, cultivar e identificar; ya sea porque sólo conocemos parcialmente sus requerimientos metabólicos, lo que impide formular medios de cultivos selectivos, o porque al tratarse de microorganismos de crecimiento lento, su aislamiento y correcta identificación requiere de períodos prolongados de tiempo, en adición a la gran cantidad de trabajo que muchas veces esto representa. Por lo anterior, constantemente se deben revisar y ajustar la información en el sistema de clasificación (Serrano y Sandoval, 2005).

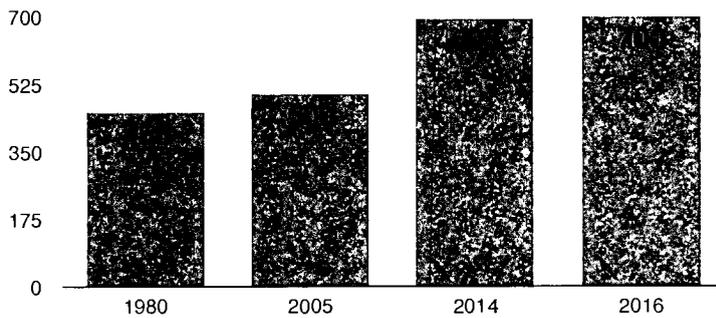
La taxonomía de los actinomicetos ha cambiado sustancialmente en las últimas décadas, incorporando nuevos métodos de identificación y criterios adicionales para la descripción de nuevas especies como se ha mencionado antes.

## LÍNEA DE TIEMPO DE LA HISTORIA TAXONÓMICA DE LOS ACTINOMICETOS





Gráfica 1. Número de especies de Nocardia Actinomadura y Rhodococcus en los últimos años (LPSN, 2016).



Gráfica 2. Número de especies del género *Streptomyces* en los últimos años (LPSN, 2016). Se puede observar que éste género ha sido de gran interés por sus múltiples metabolitos que han sido explotados desde hace décadas.

En las gráficas 1 y 2 se muestran sólo cuatro géneros de actinomicetos que tienen importancia médica; se escribe el número de especies que se habían identificado en diferentes años, como podemos observar, mientras pasan las décadas y los avances científicos crecen, las nuevas técnicas de identificación han permitido conocer ampliamente nuevas especies que anteriormente eran difíciles de separar de los grupos taxonómicos establecidos.

### 2.1.2 Clasificaciones biológicas

La clasificación de los organismos siempre ha sido una actividad importante en todas las culturas, lo cual se ve reflejado en la enorme riqueza de términos botánicos, zoológicos y microbiológicos existentes. Las clasificaciones biológicas intentan ofrecer una estimación de la diversidad, las relaciones y la organización de la vida, que sea consecuente con las ideas de la historia evolutiva

El hombre, ha tenido que reconocer y describir las similitudes y diferencias de su universo biológico, y establecer unidades, principios y leyes presentes en la variedad y el número de los seres vivos. De esta manera, se han formulado arreglos clasificatorios que han permitido entender a los seres vivos (Madigan *et al.*, 2009).

Una de las tareas más frecuentes de los taxónomos está relacionada con la elaboración de los inventarios bióticos regionales o ceparios, el listado de especies que habitan una región, el reconocimiento de sus asociaciones en un hábitat determinado y los aspectos más sobresalientes de su distribución.

Los taxónomos cotidianamente se enfrentan a describir y nombrar especies; con frecuencia se investiga un conjunto de características previamente no analizadas en un grupo de organismos, lo que conduce a efectuar un nuevo análisis filogenético y a reestructurar o proponer una clasificación consecuente con los nuevos resultados obtenidos. Éstos son aspectos de la taxonomía, que unifican las historias de la vida (Llorente, 1999).

Las colecciones son bancos de datos de gran interés para la humanidad, por ser una fuente inagotable de información de la biodiversidad de un país.

Los propósitos de las colecciones son el generar, perpetuar, organizar y difundir información. Gracias a ellas se realizan trabajos de tipo:

- Taxonómico (nombres, identificaciones, variabilidad morfológica).
- Sistemática ( estudio de las relaciones entre las especies).
- Estudios evolutivos (morfoloía, fisiología).
- Estudios de modelos predictivos de la biodiversidad del planeta (pasada y futura, rasgos de extinción).
- Investigaciones sobre el ambiente.
- Investigaciones sobre la ecología de las especies (historia natural).
- Investigaciones biomédicas, bioquímicas y en la biotecnología (estudios de compuestos químicos empleados en la medicina).
- Estudios moleculares de ADN y cladísticos, entre muchos otros.

Las colecciones pueden componerse de diferentes organismos y cada laboratorio se especializa en sus técnicas dependiendo del organismo del que se trate.

Los ceparios son “bibliotecas de microorganismos”, es decir, un lugar donde se colecciona, almacena y conserva una gran mayoría de especies bacterianas que han sido recolectadas de diferentes ambientes. Pueden obtenerse mediante aislamientos del suelo, de medios acuáticos (ríos, lagos o mares), aislamientos en plantas, animales o de lesiones en personas, etc. La procedencia dará

información sobre condiciones de crecimiento, formación de metabolitos de interés o patogenicidad y ayudará a entender a los microorganismos de nuestro entorno.

Para mantener organizadas las colecciones de microorganismos, los laboratorios deben contar con un catálogo con la monografía de cada cepa en donde se expliquen sus características, cada monografía debe contener el nombre del microorganismo (especie y género); información de la procedencia; los resultados de pruebas bioquímicas y moleculares que sirvieron para su identificación; características macroscópicas y microscópicas e información sobre su almacenamiento, principalmente.

Las colecciones de cultivos microbianos están representadas internacionalmente por la Federación Internacional de Colecciones de Cultivo (World Federation for Culture Collection, WFCC) que es un conjunto de Comités, Comisiones y Federaciones de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología (Internacional Union of Microbiological Societies, IUMS) y un miembro científico de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (Internacional Union Biological Sciences, IUBS) cuyo principal objetivo es la promoción y desarrollo de colecciones de cultivos de microorganismos y líneas celulares, también proporciona una interfaz uniforme para la comunidad científica e industrial para acceder a la información completa de recursos microbianos; sus miembros constituyen una red global para la preservación *ex-situ* de la diversidad microbiana en la Tierra. Existen 625 de colecciones microbianas registradas en Culture Collections Information Worldwide (WDCM) del WFCC.

### **2.1.3 Diversidad microbiana**

La vida microbiana ha sufrido un proceso de diversificación metabólica, utilizando diversas fuentes de energía que se encuentran disponibles en la Tierra. Sin duda alguna, cuando ciertos nutrientes comienzan a limitarse, la competencia y la selección natural estimulan la evolución de nuevos tipos de metabolismos más eficientes. Por otro lado, la vida microbiana altera la composición química del entorno a través de su propia actividad metabólica, agotando ciertos recursos y creando otros mediante la producción de productos residuales y de material celular. Estos cambios con los nuevos nutrientes y elementos han presentado desafíos para la supervivencia y oportunidades para su aprovechamiento (Madigan *et al.*, 2009), en consecuencia, la formación o desaparición de especies bacterianas.

La taxonomía caracteriza, nombra y agrupa a los organismos conforme a sus relaciones naturales. La taxonomía bacteriana ha estado centrada en aspectos de identificación y descripción y ambas actividades se han basado fundamentalmente en comparaciones fenotípicas (Madigan *et al.*, 2009).

## 2.2 ACTINOMICETOS

El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros constituyendo, aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Prescott, 2002) dependiendo de la región. En un principio los actinomicetos se incluyeron entre los hongos por su morfología y desarrollo, dotados de un micelio verdadero; debido a esto se les denominó "hongos radiados". Sin embargo, hoy en día, y dado su carácter procariontico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias (actinobacterias).

Son Gram positivas con alto contenido de G + C en el ADN, una de sus características particulares es que tienen un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares capaces de degradar la materia orgánica (Ben-Omar *et al.* 1997).

Son encontrados en suelos como saprófitos, comensales y simbioses, donde juegan un papel ecológico importante en ciclos de nutrientes del suelo, también habitan en todos los tipos de sustratos en los ecosistemas más diversos que van desde la descomposición de materiales orgánicos para las plantas, agua dulce, sedimentos, organismos marinos, insectos, entre otros (González *et al.*, 2005); algunas actinobacterias son conocidas por formar asociaciones con invertebrados y vertebrados (McNeil y Brown, 1994).

Se encuentran en casi todos los tipos de suelo y bajo condiciones extremas disminuyen levemente la concentración de la población. Su número varía en gran proporción según el caso, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de  $10^6$  UFC·g<sup>-1</sup> de suelo seco (Tate, 2000). Los principales géneros que se aíslan a partir de suelos son *Nocardia*, *Streptomyces* y *Micromonospora* (Martin, 1981); pero 95% de los actinomicetos aislados a partir del suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Lacey, 1973).

El primer actinomiceto (o actinobacteria) reconocido como patógeno fue aislado por el veterinario francés Edmund Nocard en 1888 en una epidemia de muermo bovino afectando al ganado de la isla de Guadalupe. En 1891, Eppinger reporta el primer caso de nocardiosis humana en un paciente con "síndrome pseudotuberculoso" y abscesos cerebrales generado por un microorganismo igual al descrito por Nocard anteriormente. En 1889, Trevisan crea el género *Nocardia*, con *Nocardia farcinica* como especie tipo; en 1980, Gordon y Mihm proponen, y es oficialmente aceptado el nombre de *Nocardia asteroides* para la especie tipo, reemplazando a *N. farcinica* hasta nuestros días, designando una nueva cepa (ATCC19247) como cepa tipo, en lugar de la aislada originariamente en 1888 (Beaman, 1994).

Por su relevante interacción con otros organismos, los actinomicetos deben identificarse y clasificarse adecuadamente para un correcto diagnóstico y tratamiento; de ésta manera evitamos pérdidas de recursos vegetal, animal y humano, y aprovechamos los beneficios que éstos nos ofrecen.

## 2.1 Los actinomicetos y las plantas

Las bacterias asociadas a plantas puede ser benéficas o perjudiciales. Todas las superficies de las plantas tienen microbios en ellos, y algunos microbios viven dentro de las plantas. Algunos son residentes y algunos son transitorios. Las bacterias individuales no pueden ser vistos sin el uso de un microscopio, sin embargo, grandes poblaciones de bacterias se hacen visibles como agregados en forma líquida, como biopelículas en las plantas o como suspensiones viscosas sobre las estructuras de las plantas. Las bacterias como patógenos de las plantas pueden causar enfermedades económicamente perjudiciales, que van desde manchas, mosaicos o pústulas en las hojas y frutas, o necrosis de los tubérculos (Vidaver, 2004).

En comparación con otras bacterias, los actinomicetos, aparentemente desempeñan un papel poco relevante en enfermedades de las plantas. Económicamente, las enfermedades causados por actinomicetos en cultivos son importantes. Hasta hace unos años estos han sido detectados principalmente en papa, zanahoria, rábano y remolacha. La situación es especialmente insatisfactoria en el caso de la papa donde sintomatologías distintas son observadas, causados por diferentes actinomicetos (Locci, 1994). Por ejemplo, la SAGARPA (2002) identificó a *Streptomyces sp.* como plaga en productos agropecuarios, específicamente en la semilla de papa, en inspecciones en Coahuila. En la zona norte de Sinaloa se cree que la sarna común, enfermedad que afecta raíces y tubérculos fue causada por *Streptomyces* causando severas pérdidas de producción del cultivo de papa durante el periodo 2008-2009 (CONPAPA, 2010). En los años 2011 y 2012 se observaron tubérculos de papa fina con síntomas severos de pudrición y sarna en campos agrícolas del Valle del Mayo, Sonora, México, dicha enfermedad presentó una incidencia en la región que fluctuó entre 30 a 40% (Leyva *et al.*, 2014).

Al saber que la papa es una de las principales hortalizas que se producen en México y su cultivo es uno de los más importantes; sólo superado por maíz, frijol, trigo y arroz; podemos calcular las pérdidas que provocaría una enfermedad sobre ésta hortaliza. El cultivo de papa tiene una producción aproximada de 1,537,000 toneladas, que genera un valor de 11,622,047 (miles de pesos) y ocupa el sexto lugar en valor comercial del producto a nivel nacional. En nuestro país se dedican a la producción de este cultivo 8,700 productores, además de que se generan alrededor de

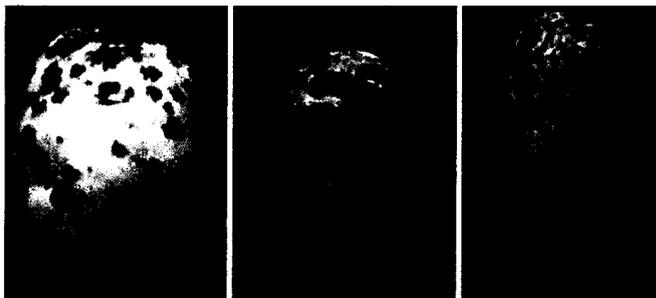


Figura 1. Infección de la papa. Papa fina infectada con "sarna común" causada por *Streptomyces* (CONPAPA,

17,500 empleos directos, 51.600 empleos indirectos y 6.9 millones de jornales/año (Diario Oficial de la Federación, 2014), por lo que el control de sus plagas es de suma prioridad.

La Ley Federal de Sanidad Vegetal se encarga de promover medidas fitosanitarias aplicables en materia de sanidad vegetal que tendrán como finalidad establecer los requisitos, especificaciones, criterios y procedimientos para controlar la movilización de vegetales, sus productos y subproductos, vehículos de transporte, materiales y equipos susceptibles de ser portadores de plagas, así como de agentes patogénicos que puedan representar un riesgo fitosanitario. Se sujetó al artículo 5o. del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial de Comercio, para la evaluación del riesgo y determinación del nivel adecuado de protección fitosanitaria (OMC, 1994; Diario Oficial de la Federación, 2014).

Por otra parte, desde un punto de vista más satisfactorio, los actinomicetos son importantes para la nutrición de las plantas como *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Frankia* y *Actinomyces* (Burbano, 1989). Éstas bacterias se asocian a las raíces de las plantas y aumentan su crecimiento y desarrollo ayudando a la fijación de nitrógeno; también pueden protegerlas contra otros organismos del suelo. Algunos ejemplos de asociaciones benéficas se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 1. Actinomicetos que fomentan el crecimiento de diferentes familias de plantas mediante interacción mutualista.**

Actinomiceto	Planta con quien interactúa	Acción de la interacción	Autor
<i>Frankia</i>	<i>Familias: Betulaceae, Casuarinaceae, Coriariaceae, Dasticaceae, Elaeagnaceae, Myricaceae, Rhamnaceae y Rosaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mejoramiento del suelo, reforestación</li> <li>• Alternativa para sistemas silvopastoriles</li> </ul>	Berliner y Torrey, 1989
<i>Micromonospora</i>	<i>Arachis hypogaea, Cicer arietinum, Glycine max, culinarium Lens, Lupinus angustifolius, Lupinus gredensis, Medicago sativa, Ononis sp., Ornithopus sp., P. sativum, Trifolium sp., Vicia sp. y Mucuna sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endófito de leguminosas, fija nitrógeno en las raíces</li> <li>• Crecimiento vegetal</li> </ul>	Trujillo <i>et al.</i> , 2007

<i>Streptomyces</i>	Familia <i>Fabaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endófito de leguminosas, fija nitrógeno en las raíces</li> <li>• Crecimiento vegetal</li> </ul>	Dimkpa et al., 2008 Tokala et al., 2002
---------------------	-------------------------	--	--

Se ha determinado que la cantidad de nitrógeno fijado por leguminosas arbóreas gracias a la asociación que tienen con microorganismos puede ser hasta de 300 kg de N<sub>2</sub>/ha/año, mientras que en leguminosas herbáceas asociadas con microorganismos es de 100 a 150 kg de N<sub>2</sub>/ha/año (SAGARPA, 2014). Además, en los países tropicales de montaña es un gran recurso natural al que podemos recurrir para enfrentar un buen número de problemas del ambiente.

Se ha evaluado el efecto antagonista de *Streptomyces spp.* contra hongos fitopatógenos como *Alternaria sp.* que afecta tomate, papa y berenjena; los hongos que ataca pueden ser *Rhizoctonia sp.* y *Fusarium sp.* presentes en el cultivo del frijol y ejote causando daños en la semilla impidiendo su germinación; y también contra el hongo *Colletotrichum sp.* que ataca otros cultivos de relevancia económica (Dávila *et al.*, 2013; SAGARPA, 2014). Este método de control es persistente en el suelo e inofensivo para plantas y animales, no causa envenenamiento por residuos y es de bajo costo (Sánchez-Ovalle *et al.*, 2011).

Por otra parte, también se sabe que la simbiosis formada por *Frankia* y el nódulo de las plantas actinorrízicas (árboles perennes) pueden ser usados en restauración ecológica y producción de madera, una alternativa para reforestar bosques o suelos poco fértiles.



Figura 2. Nódulos producidos por la asociación de *Frankia* con una planta actinorrízica (D.R. Benson. University of Connecticut, 2015).

Se han descrito en la actualidad alrededor de 200 especies de plantas actinorrízicas, distribuidas en ocho familias botánicas, que son portadoras de nódulo fijadores de nitrógeno formados por *Frankia* (Valdés *et al.*, 2006).

## 2.2 Los actinomicetos y los animales

Los animales, al estar en contacto directo con el suelo por su alimentación y hábitat, pueden contraer múltiples enfermedades, algunas pueden ser ocasionadas por los actinomicetos. Se han identificado a éstas bacterias como agentes causales de enfermedades en ovinos, bovinos y porcinos (McGavin y Zachary, 2007) tales como linfadenitis (Kumar, 2013), mastitis (Murakami *et al.*, 1998), micetoma (Condas *et al.*, 2013), tuberculosis (Serrano y Sandoval, 2005), entre otras infecciones.

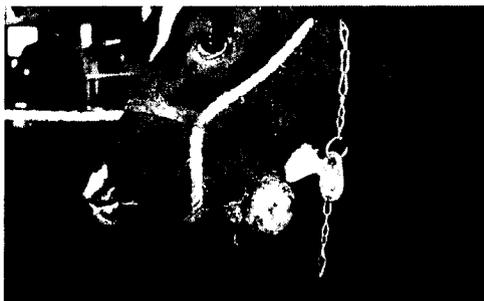


Figura 3. Infección en animales. Lesión submaxilar en bovino causada por *Actinomyces*. (Enciclopedia bovina:<http://www.fm.vz.unam.mx>)

La mayoría de las infecciones por actinomicetos en animales son causadas por *Nocardia sp.* la cual provoca reacciones tisulares supurativas y granulomatosas, principalmente en individuos inmunodeprimidos. En el Cuadro siguiente se resumen reportes y estudios en animales asociados con infecciones por actinomicetos.

**Cuadro 2. Actinomicetos que actúan como huéspedes en animales provocando infecciones.**

Actinomiceto	Animal	Tipo de infección	Autor
<i>Nocardia sp.</i>	Bovinos	Mastitis y leche contaminada	Ribeiro <i>et al.</i> , 2008
<i>Nocardia asteroides</i>	Yeguas	Aborto por lesiones en pulmones, hígado y placenta en fetos.	Bolon <i>et al.</i> , 1998 Hong <i>et al.</i> , 1993
<i>Nocardia asteroides</i>	Perro	Disnea, anorexia y mucosas descoloridas y finalmente la muerte	Ramos, 1990
<i>Nocardia sp.</i>	Perro	Dermatitis atópica y enfermedad neurológica	Paul <i>et al.</i> , 2010
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	Cabras	Enfermedades pulmonares	Domenis <i>et al.</i> , 2009
<i>Nocardia salmonicida</i>	Salmón	Nado lento y finalmente la muerte	Isik <i>et al.</i> , 1999

<i>Nocardia sp.</i>	Búfalo Beluga (de acuario) Mapaches. renos.	Enfermedades pulmonares, peritonitis y anorexia	Pal <i>et al.</i> , 1997 Macneill, 1997 Vemireddi <i>et al.</i> , 2007
<i>Nocardia sp.</i>	Equinos	Neumonía fibrosa, Hepatitis necrosante y aborto	Bolon <i>et al.</i> , 1998
<i>Actinomyces bovis</i>	Bovinos Porcinos Equinos	"mandíbula terrosa"	Mas <i>et al.</i> , 2008 Serrano <i>et al.</i> , 2007
<i>Actinomyces pyogenes</i>	Bovinos	Mastitis y peritonitis	Serrano <i>et al.</i> , 2007
<i>Actinomyces pyogenes</i>	Bovinos Porcinos Corderos Conejos Equinos	Peritonitis y abortos	Serrano <i>et al.</i> , 2007
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	Bovinos	Tumores	Oakey <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycobacterium avium</i>	Yeguas	Abortos	Hélie y Higgins, 1996 Cline <i>et al.</i> , 1991
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Serpientes Tortugas Lagartos Focas Leones marinos Flamingos	Lesiones en diversos órganos	Soldati <i>et al.</i> , 2004 Forshaw y Phelps, 1991 Kock <i>et al.</i> , 1999 Lairmore <i>et al.</i> , 1985
<i>Rhodococcus equi</i>	Equinos	Neumonía	Muscattello <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhodococcus equi</i>	Porcinos	Nódulos submaxilares	Takai <i>et al.</i> , 1996
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> y <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Yeguas	Abortos	Poonacha y Donahue, 1995 Henricson <i>et al.</i> , 2000
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Ovinos	Linfadenitis	Padilla <i>et al.</i> , 2008
<i>Corynebacterium sp.</i>	Tortuga Gato Foca	Lesiones en diferentes órganos	Collins <i>et al.</i> , 2001
<i>Dermatophilus congolensis</i>	Caprinos Equinos	Dermatitis	Acosta y Pérez, 2003 Moncada y Callejas, 1988

Es necesario mencionar que *Nocardia* ha sido involucrada en casos de mastitis y ha producido un aumento aparente en todo el mundo en la incidencia de esta infección tal vez debido a la transmisión de este patógeno ambiental oblicuo. *Nocardia nova*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia puris*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia veterana*, *Nocardia africana*, y *Nocardia arthritidis* fueron detectados como especies que provocan mastitis (Condas *et al.*, 2013).

La leche en especial es un producto sumamente vulnerable a riesgos microbiológicos que podrían afectar su calidad sanitaria, las enfermedades que pueden llegar a afectar al ganado caprino productor de leche como la brucelosis y mastitis pueden afectar directamente la inocuidad y calidad de la leche, representando un peligro potencial para la salud pública si no se aplican sistemas de minimización de riesgos contempladas en las diferentes etapas desde la producción, ordeña y hasta su transporte. Un diagnóstico realizado por SAGARPA en 2009 en Sonora, identificó como principales problemas en producción de leche la falta de forraje en cantidad y calidad; la fertilidad de los animales del 50%, vacas de primer parto a los 40 meses de edad; 80% de incidencia de mastitis, 22% de productores inseminaban y 33% hacían diagnóstico de gestación.

La mastitis es una infección que afecta a los caprinos, bovinos y ovinos. La infección normalmente se propaga durante la ordeña y genera mala calidad de la leche. El Delegado de la SAGARPA, Ernesto De Lucas Palacios señaló que para SAGARPA es primordial el reforzamiento de programas y trabajos que ayuden a mejorar la calidad de la leche, para combatir factores de riesgo como la mastitis, que afecta al 20% de las vacas en producción (SAGARPA, 2010).

Otro actinomiceto que es importante mencionar es *Mycobacterium bovis* que provoca tuberculosis bovina, la cual se caracteriza por la formación de granulomas, afecta a bovinos y a otros animales domésticos. Es considerada una zoonosis porque es transmisible al hombre, quien la contrae al ingerir productos lácteos contaminados y no pasteurizados o por el contacto con animales infectados (SAGARPA, 2012). En el año 2000 se reportaron casos de bovinos infectados con esta bacteria en la mayoría de los estados del país (SENASICA, 2012).



Figura 4. Lesiones pulmonares por tuberculosis aguda en becerro

La presencia de la enfermedad en los animales, es un constante riesgo de diseminación hacia las unidades productivas libres de la enfermedad, e inclusive ha sido un factor determinante que ha motivado restricciones y condiciones impuestas por Estados Unidos. La prevención, el control de las enfermedades zoonóticas y la protección de la salud pública son una prioridad por el aumento de la población mundial (Aiello y Susan, 2000), pues se podrían prevenir epidemias o enfermedades provocadas por infecciones provenientes de animales.

Aunque tradicionalmente se ha considerado a los actinomicetos como agentes patógenos en animales, en los últimos años se ha descubierto que también existen interactuando de forma simbiótica con éstos como se muestra en el siguiente Cuadro.

**Cuadro 3. Simbiosis de actinomicetos con animales.**

<b>Actinomiceto</b>	<b>Animal</b>	<b>Tipo de simbiosis</b>	<b>Autor</b>
<i>Streptomyces, Nocardiosis y Oerskovia</i>	Cabra y otros rumiantes.	Nativos en el tracto gastrointestinal	Tan <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces, Mycobacterium, Corynebacterium y Rhodococcus</i>	Termitas	Nativos en el tracto gastrointestinal	Watanabe <i>et al.</i> 2003
<i>Streptomyces</i>	Abejas y hormigas	Protege contra patógenos durante la primavera	Kaltenpoth <i>et al.</i> , 2006 Currie <i>et al.</i> , 1999
<i>Myceligenans cantabricum</i>	Corales y estrellas	En estudio	Sarmiento-Vizcaíno <i>et al.</i> , 2015.

### 2.3 Los actinomicetos y el hombre

Los actinomicetos pueden interactuar con el hombre, pero cuando es así, provoca una infección llamada actinomycetoma.

En 1888, Nocard reconoció por primera vez el potencial patogénico de este grupo de microorganismos. Los actinomicetos aerobios de importancia médica pueden causar una significativa morbilidad y mortalidad, especialmente en los pacientes severamente inmunocomprometidos altamente susceptibles, incluyendo los receptores de trasplante y los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. Sin embargo, el diagnóstico de estas infecciones puede ser difícil, y la terapia efectiva puede ser complicado por la resistencia antimicrobiana (McNeil y Brown, 1994).

El actinomicetoma es una infección subaguda o crónica de la piel y del tejido subcutáneo, de tipo granulomatoso producida por actinomicetos, cuyo hábitat principal es el suelo y que por vía de traumatismos punzo penetrantes causados con espinas o astillas de maderas contaminadas con los agentes etiológicos logran penetrar al organismo de los humanos o de los animales.

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre el actinomicetoma están basados en estudios de epidemiología descriptiva, de manera que la verdadera incidencia, prevalencia y la distribución geográfica mundial del actinomicetoma aún no es bien conocida (Serrano y Sandoval, 2005).

El actinomicetoma se encuentra principalmente en regiones ubicadas cerca del trópico de Cáncer, entre las latitudes 15° Sur y 30° Norte. Una mayor incidencia se encuentra en México, Venezuela, Brasil, norte de Argentina, algunos países de centro América, Sudán, Senegal, Somalia, India y Pakistán; en estas regiones la enfermedad es endémica. Se observan además casos esporádicos en otros países de América del sur, Estados Unidos, Arabia Saudita, Yemen y Europa (Barry, 2009). En México, se ha descrito casos prácticamente en toda la república, predominando en los estados de Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (Serrano y Sandoval, 2005).



Figura 5. Micetoma en tórax causado por *N. brasiliensis* y micetoma en pie causado por *Actinoadura pelletieri*, se observan numerosas fistulas y nódulos (Serrano *et al.*, 2007).

Un estudio realizado en México por López-Martínez y colaboradores en 2013 arrojó los siguientes datos: El total de casos de actinomicetoma detectados en las dos últimas décadas hasta 2012 en 11 centros de diagnóstico micológico fue de 3,933; donde 2,920 fueron hombres (75.6%) y 940 mujeres (24.4%).

La frecuencia más elevada fueron los campesinos quienes en su vida cotidiana se exponen a los agentes causales a través de heridas traumáticas contaminadas. Las amas de casa de zonas rurales dedicadas a las labores domésticas ocuparon el segundo lugar en frecuencia; esto se explica porque ellas también participan, aunque en menor grado, en las actividades del campo.

El lugar con mayor número de casos corresponde a Jalisco (676 casos), Morelos (429 casos), Nuevo León (347 casos), Guerrero (302 casos) y Veracruz (264 casos).

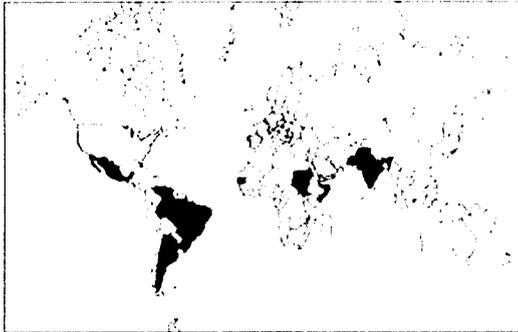


Figura 6. Actinomictoma en el mundo. En rojo se señalan los países con mayor reporte de casos, en amarillo los países con bajo reporte de casos y los países en rosa son casos esporádicos.

La localización corporal más frecuente es en los miembros inferiores, en particular en los pies(60.29%), de menor frecuencia los miembros superiores, tronco y cabeza, cuando se localiza en tórax, generalmente lo hace en el tercio superior del dorso, donde la inoculación puede producirse por acarrear material contaminado, y es de destacar el peligro de invasión a pulmón.

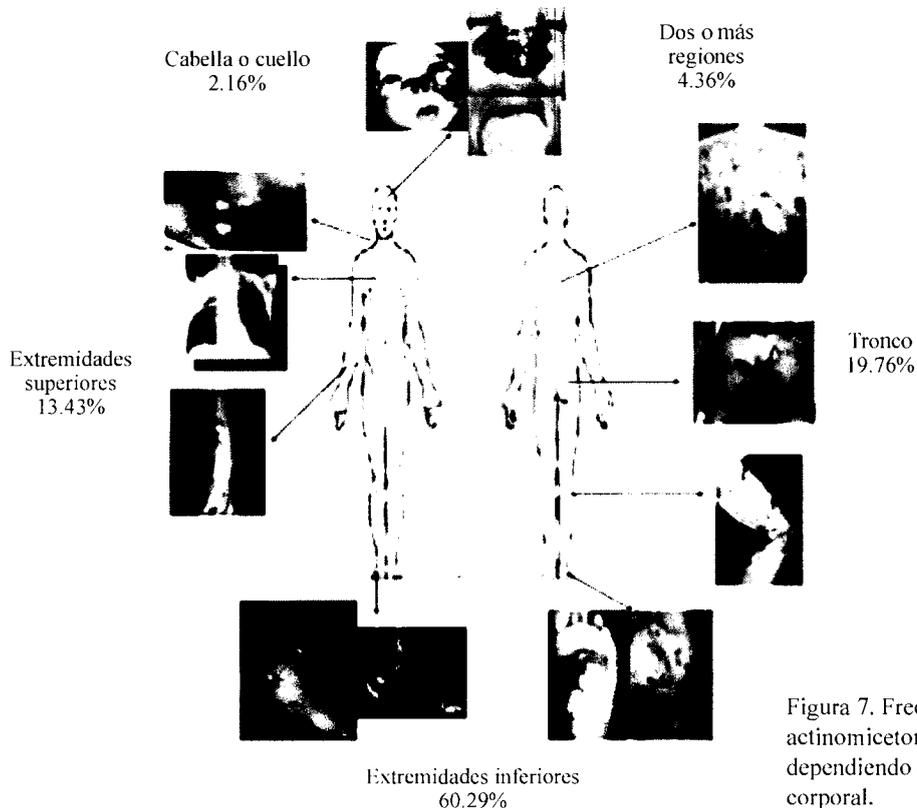


Figura 7. Frecuencia del actinomictoma dependiendo de la región corporal.

La identificación taxonómica de los actinomicetos, tradicionalmente, se realiza según las características morfológicas y 5 pruebas bioquímicas. Se cree que el principal agente de infección fue *Nocardia brasiliensis*, en 88% de los casos reportados.

Los actinomicetos de importancia médica pueden causar una significativa morbilidad y mortalidad, especialmente en los pacientes severamente inmunocomprometidos altamente susceptibles, incluyendo los receptores de trasplante y los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana. Sin embargo, el diagnóstico de estas infecciones puede ser difícil, y la terapia antimicrobiana efectiva puede ser complicado por la resistencia antimicrobiana (McNeil y Brown, 1994).

La población más afectada son los habitantes de áreas rurales, quienes por sus actividades laborales tienen mayor riesgo de sufrir heridas traumáticas sépticas exponiéndose a los agentes causales, además de tener acceso limitado a los servicios de salud. Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fistulas a través de las cuales se elimina pus y granos, constituidos por filamentos.

La frecuencia del micetoma está relacionada con el desarrollo socioeconómico de los países donde se presenta (López *et al.*, 2013).

- África es un continente donde se registra la mayor frecuencia de micetoma del mundo.
- En México, es el país latinoamericano que registra el mayor número de casos. Aunque en países como Brasil y Venezuela, el número de casos reportados también es importante.
- En Estados Unidos y Europa se han reportado casos esporádicos.

#### **2.4 Metabolitos producidos por los actinomicetos**

Su metabolismo extremadamente rico está muy frecuentemente acompañado por la producción de metabolitos secundarios, éstos desempeñan un papel importante en el mantenimiento, señalización y colonización del hábitat microbiano (González *et al.*, 2005). Son responsables de la producción de alrededor de la mitad de los metabolitos secundarios bioactivos descubiertos, especialmente antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores y enzimas. Estos pueden ser un recurso para el descubrimiento biotecnológico (Wu *et al.*, 2009).

De los aproximadamente 8,000 antibióticos (Evangelista y Moreno, 2007):

- 45.6% producidos por *Streptomyces*
- 16% por otros actinomicetos,
- 16.9% por otras bacterias
- 21.5% por hongos

Está comprobado que más de 500 sustancias antibióticas distintas son producidas por estreptomicetos y gran número de ellos han sido estudiados en forma química. Algunos actinomicetos producen más de un antibiótico, la nutrición de un organismo puede originar un cambio en la naturaleza del antibiótico que se produce, el organismo por lo general es resistente a sus propios antibióticos, pero en ocasiones puede ser sensible a estos (Evangelista y Moreno, 2007).

Después de los antibióticos, las enzimas son los productos más importantes de los actinomicetos. Actualmente las enzimas de origen microbiano, incluyendo las producidas por actinomicetos, son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, en la fabricación de detergentes, en la industria textil y farmacéutica, en terapia médica, química biorgánica y biología molecular. La demanda en la utilización de enzimas en diferentes procesos biotecnológicos ha ido en aumento, lo cual genera la necesidad de buscar nuevas fuentes biológicas para la obtención de mejores actividades, que puedan ser producidas en grandes cantidades y a un bajo costo, una alternativa es el uso de microorganismos, tales como los actinomicetos que producen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas extracelulares con capacidad de degradar los polímeros de la materia orgánica disponible (Evangelista y Moreno, 2007).

Algunos ejemplos de metabolitos producidos por éstas bacterias son los siguientes:

- Productores de antibióticos: Estreptomicina (*Streptomyces griseus*), tienamicina (*Streptomyces cattleya*), anfotericina B (*Streptomyces nodosus*), cloranfenicol (*Streptomyces venezuelae*), lincomicina (*Streptomyces lincolnensis*), etc.
- Productores de enzimas:
  - Degradadores de celulosa: *Micromonospora*, *Streptomyces* (presentes en el estiércol y los vegetales en descomposición) y *Streptosporangium*
  - Productores de amilasas: *Streptomyces*
  - Productores de quitinasas: *Streptomyces olivaceoviridis* y *Streptomyces venezuelae*
- Productores de antitumorales: Actinomicina D (*Streptomyces sp.*), mitomicina (*Streptomyces caespitosus*), bleomicina (*Streptomyces sp.*), neomicina (*Streptomyces fradiae*), etc.
- Productores de inmunosupresores: Policétidos FK-506 (*Streptomyces tsukubaensis*), rapamicina (*Streptomyces hygroscopicus*), etc.
- Productores de antiparasitarios: Monensina (*Streptomyces cinnamomensis*), lasalócido (*Streptomyces lasaliensis*), salinomicina (*Streptomyces albus*), etc.
- Algunos metabolitos, como la monensina, funcionan como ionóforos que hacen más eficiente la digestión de los alimentos consumidos por los rumiantes (Bretschneider, 2009).

## 2.3 Cepas de estudio

El laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM Xochimilco cuenta con una colección de actinomicetos de 837 cepas obtenidas de diferentes fuentes, ésta colección no se encuentra registrada en alguna base de datos nacional o internacional ya que se encuentra en proceso de un adecuado análisis, identificación y clasificación para poder formar parte de un registro de referencia.

La recolección de diferentes cepas de actinomicetos del Laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM Xochimilco data de hace más de 30 años y su función principal es la conservación *ex situ* de biodiversidad de actinomicetos; han sido de gran importancia y estudio en diferentes proyectos de investigación, proyectos escolares, docencia y tesis de licenciatura, maestría y doctorado.

En el año 2004 se identificó una nueva especie a partir de ésta colección, Rodríguez-Nava reclasificó a la ahora llamada *Nocardia mexicana* a partir de aislamientos de micetomas humanos (Rodríguez-Nava *et al.*, 2004).

En 2005, Ramírez-Durán creó la primer colección de actinomicetos halófilos en México a partir de cepas que pertenecen a ésta colección. Este estudio pionero permitió conocer la presencia y distribución geográfica de *Saccharomonospora* (en la zona sur de México) y de *Actinopolyspora* (en la zona norte de México). Además dio a conocer características hasta entonces desconocidas de los actinomicetos halófilos.

Los ejemplos anteriores y otros no mencionados han sido estudios realizados con ésta colección que ha ido creciendo con el tiempo. La colección se ha formado a partir de las muestras donadas de las siguientes instituciones:

- Hospital General “Dr. Manuel Gea González”
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. InDRE
- Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”
- Instituto dermatológico de Jalisco “Dr. José Barba Rubio”
- Cepario del Laboratorio de Producción de Biológicas de la UAM-X
- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán
- Grupo de Actinomycetales de Mérida, Venezuela

### **3. HIPÓTESIS**

El análisis en conjunto de las pruebas actuales fenotípicas, genotípicas y filogenéticas modificarán la clasificación establecida con métodos tradicionales, de las cepas presentes en la colección de actinomicetos depositadas en el Laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM-X.

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Clasificar en su respectivo taxón cepas de actinomicetos anteriormente identificadas con métodos tradicionales, haciendo uso de técnicas actuales de identificación de bacterias.

#### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Realizar una caracterización fenotípica de los actinomicetos de estudio.

Realizar una caracterización genotípica y filogenética de los actinomicetos de estudio.

Interpretar y recopilar la información obtenida para establecer las bases para la creación de un catálogo de referencia de las cepas de actinomicetos estudiadas.

## 5. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los éxitos en la Sistemática Bacteriana, aun no se ha alcanzado el consenso para definir “especie bacteriana”. Los bacteriólogos dicen que la diversidad de microorganismos esta organizada en *clusters* discretos fenotípicos y genéticos y que están separados por amplias diferencias y a estos se les ha llamado especies (Sneath, 1985). Sin embargo, hay que reflexionar si la especie debe ser considerada por sus características específicas tanto desde el punto de vista genético como ecológico o evolutivo.

A partir de 1980, los cambios en el listado de especies de los actinomicetos ha aumentado principalmente en los géneros *Nocardia*, *Actinomadura*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (LPSN, 2016), esto ha demostrado la gran heterogeneidad entre las especies ya conocidas, por lo que se han realizado diversos estudios tratando de separar a éstas bacterias, y aprovechando la tecnología reciente, de acuerdo a sus diferencias más sutiles.

Encontrar una nueva metodología que permita identificar a los actinomicetos a nivel de especie es de gran importancia, además de que debe ser reproducible en laboratorios clínicos, pues de eso depende un diagnóstico oportuno y tratamiento eficaz en clínica veterinaria y humana; también permite el descubrimiento de nuevas moléculas activas que ayuden en la biotecnología o la creación de control biológico en agricultura; entre otras actividades. El conocer nuestro entorno microbiano ayuda a sacarle provecho a las bacterias bien conocidas.

Por lo anterior es importante cumplir con los objetivos de la taxonomía: descubrir, describir y clasificar la diversidad de los organismos vivos (Logan y Berkeley, 1984). Así se podrá aprovechar la información recolectada para estudios o aplicaciones tecnológicas posteriores.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Diseño del estudio

Tipo de estudio: Descriptivo, prospectivo parcial, transversal y observacional

Unidad de estudio: 51 cepas de actinomicetos donadas por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE).

Etapas del estudio:

1. Pruebas fenotípicas
2. Pruebas genotípicas y filogenéticas
3. Análisis taxonómico
4. Creación de un catálogo (anexo a la tesis)

### 6.2 Condiciones de crecimiento de las cepas

El medio de cultivo es una mezcla de nutrientes necesarios para permitir en condiciones favorables de pH, temperatura, humedad y oxígeno el crecimiento de las cepas de estudio, además de estar libre de todo microorganismo contaminante. Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica debe contener por lo menos, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En ocasiones serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento; con el fin de tener las sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar.

*Nocardia* generalmente crece en la mayoría de los medios de laboratorio, crecen lentamente, en especial si se encuentran en medios no selectivos, son estrictamente aerobios y tienen la capacidad de crecer a diferentes temperaturas. La mayoría de las bacterias patógenas, como las utilizadas aquí, requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano; por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

Las cepas se sembraron para su reactivación en medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (ADS), (Bioxon 214700), a 37°C en incubación hasta su crecimiento (4-30 días).

#### **Agar Dextrosa Sabouraud:**

- |     |                    |
|-----|--------------------|
| 40g | Dextrosa           |
| 5g  | Peptona de carne   |
| 5g  | Peptona de caseína |
| 15g | Agar               |
| 1L  | Agua               |

Posteriormente se resembraron en medio sólido del mismo en cajas Petri con la técnica de “botón” para observar su crecimiento colonial y también en 50 mL de medio dextrosa Sabouraud en matraz de 100 mL Erlenmeyer con agitación a 200 rpm, para la realización de pruebas.

### 6.3 Pruebas fenotípicas

El análisis fenotípico de las características observables de una bacteria proporciona numerosos rasgos que pueden utilizarse para la diferenciación entre especies

- a) Morfología macroscópica: Se observó las características de las colonias en forma de “botón” y se anotarán las características de color, forma, textura y tamaño.

**Cuadro 4. Características de la colonia que se describirán**

Color	Forma	Textura	Tamaño
Blanco	Redonda Estrella Irregular	Plana	Chica Mediana Grande
Crema		Elevada	
Amarillo		Rugosa	
Anaranjado		Suave	
Rojo		Dura	
Café			

- b) Morfología microscópica: Se realizó la tinción de Gram para búsqueda de características específicas en un microscopio Leika mod. 1349521X.

**Cuadro 5. Características de la célula que se describirán**

Forma de la célula	Tipo de Gram
Cocos	Gram-positivas Gram-negativas
Bacilos	
Hifas	

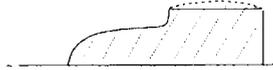
- c) Pruebas bioquímicas: Las cepas en medio líquido se utilizaron para las pruebas bioquímicas automatizadas y estandarizadas API® 20E, API® 50CH, API® 20NE y API® ZYM del laboratorio bioMérieux®; y para sensibilidad a antibióticos, dando un total de 134 pruebas.

Cada prueba se realizó de la siguiente manera:

## API 20E

1. Se agregó agua destilada en los alvéolos para crear un ambiente húmedo.
2. Se agregó la suspensión bacteriana con referencia a 1 de McFarland en los tubos de la galería evitando formar burbujas al fondo del tubo.

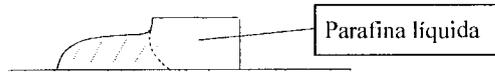
- Para las pruebas CIT, VP y GEL se llenó el tubo y la cúpula.



- Para las demás pruebas se llenó sólo los tubos.



- Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE se llenó la cúpula con aceite de parafina para crear un ambiente anaerobio



3. Se cerró la cámara e incubó a 37°C por 7 días.
4. Se realizó la lectura cada 24 horas e interpretó de acuerdo con la Tabla del instructivo.
  - Se agregó una gota de reactivo TDA a la prueba TDA. Un color rojo-marrón indicó positivo.
  - Se agregó una gota de reactivo JAMES a la prueba de IND. Un color rosa indicó positivo. Esta prueba se realizó al final por posible desprendimiento de gases.
  - Se agregó una gota de reactivo VPI y VP2 a la prueba VP y esperamos 10 min. Un color rosa-rojo indicó positivo, si aparece 10 minutos después es negativo.
5. Las pruebas que no se encontraron bien definidas se incubaron 24 horas más y posteriormente se realizó la lectura sin agregar nuevamente los reactivos.
  - En los ensayos complementarios (reducción de nitratos y nitritos y formación de nitrógeno). Se agregó una gota de reactivos NIT1 y NIT2 en la prueba GLU y esperamos de 2 a 5 min.
  - Un color rojo indicó positivo (NO<sub>2</sub>).

- Un color amarillo o presencia de microburbujas indicó negativo (N<sub>2</sub>) y se agregó de 2 a 3 mg. de Zinc en la prueba GLU y esperamos 5 minutos; amarillo indicó positivo (N<sub>2</sub>) si cambió a naranja-rojo indicó negativo (NO<sub>2</sub>).

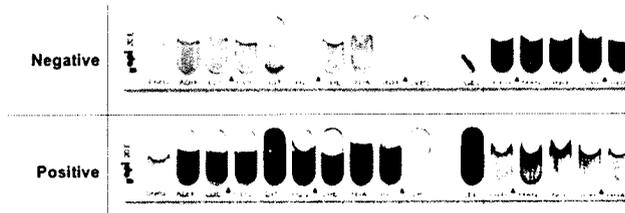
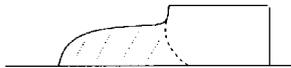


Figura 8. Resultados negativos y positivos de la prueba API 20E.

### API 50 CH

1. Se agregó agua destilada en los alvéolos para crear un ambiente húmedo.
2. Se realizó una suspensión de turbidez igual al patrón 3 de McFarland y anotar el número de gotas utilizadas.
3. Se usó una ampolla de API 50CHB/E Medium para inocular con dos veces el número que gotas de la suspensión anterior.
4. Se agregó la suspensión bacteriana en los tubos de la galería evitando formar burbujas al fondo del tubo.



5. Se cerró la cámara e incubó a 37°C por 7 días.
6. Se realizó la lectura cada 24 horas e interpretó de acuerdo con la Tabla del instructivo.
7. Un color amarillo y negro para esculina (tubo 25) indicó positivo.
8. Las pruebas que no se encontraron bien definidas se incubaron 24 horas más y posteriormente se realizó la lectura.

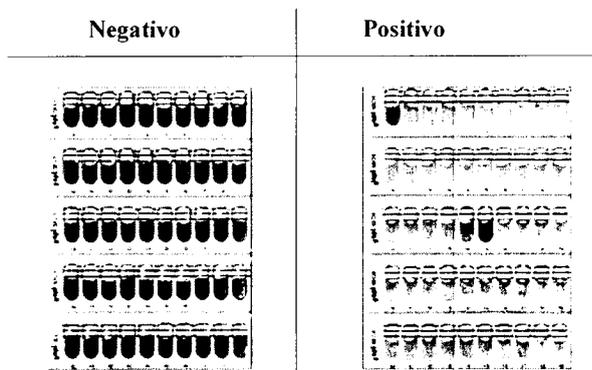
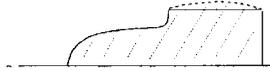


Figura 9. Resultados negativos y positivos de la prueba API 50CH.

## API ZYM

1. Se agregó agua destilada en los alvéolos para crear un ambiente húmedo.
2. Se añadió de la suspensión bacteriana de 6 de patrón de turbidez de McFarland 65 microlitros por cúpula evitando formar burbujas al fondo del tubo.



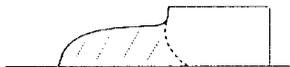
3. Se cerró la cámara e incubó a 37°C por 24 horas.
4. Se realizó la lectura e interpretó de acuerdo con la Tabla del instructivo.
5. Se añadió una gota de reactivo ZYM A (tensoactivo) y reactivo ZYM B en cada cúpula.
6. Las pruebas que no se encontraron bien definidas se incubaron 24 horas más y posteriormente se realizó la lectura.



Figura 10. Resultados positivos de la prueba API ZYM.

## API 20NE

1. Se agregó agua destilada en los alvéolos para crear un ambiente húmedo.
2. Se rellenaron los tubos de NO<sub>3</sub> a PNPG con la suspensión bacteriana de patrón 0.5 de McFarland



- Se transfirieron 200 microlitros de la suspensión McFarland en la ampolla API AUX Medium
- Se rellenaron los tubos y cúpulas desde GLU a PAC.



- Se rellenaron con aceite de parafina los ensayos GLU, ADH y URE para crear un ambiente anaerobio.

3. Se cerró la cámara e incubó a 37°C por 7 días.
4. Se realizó la lectura cada 24 horas y se interpretó de acuerdo con la Tabla del instructivo.
  - Se anotaron los resultados de los ensayos convencionales (GLU, ADH, URE, ESC, GEI, y PNPG).
  - Se añadió una gota del reactivo NITI y NIT2 en la cúpula de NO<sub>3</sub>. Después de 5 min un color rojo nos indicó positivo. Si fue negativo, se agregó 2-3 mg de reactivo Zn en la cúpula de NO<sub>3</sub>. Después de 5 min incoloro indicó positivo, un color rosa-rojo indicó negativo.
  - Se añadió una gota de reactivo James en TRP, un color rosa en toda la cúpula indicó positivo (solo se deben leer 24 horas después).
  - En los ensayos de asimilación una cúpula turbia indicó positivo.
5. Las pruebas que no se encontraron bien definidas se incubaron 24 horas más y posteriormente se realizó la lectura. Antes de incubar se quitó con una pipeta los reactivos de NO<sub>3</sub> y TRP para evitar la reacción con otras pruebas.
6. La prueba de oxida se realizó poniendo una muestra de la colonia en papel filtro de 6mm y posteriormente una gota de Oxidasa sobre la colonia. Después de 20 segundos se observó, un color azul indicó positivo, incoloro indicó negativo.

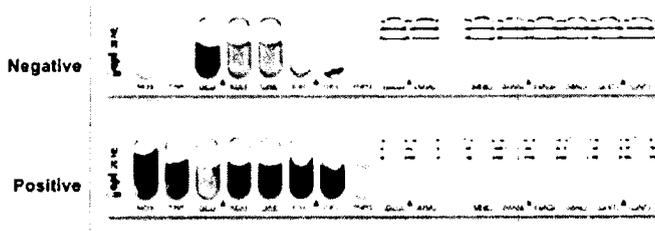


Figura 11. Resultados negativos y positivos de la prueba API 20NE.

### Sensibilidad a antibióticos

- Cada cepa se sembró en medio líquido Sabouraud hasta su crecimiento
- Posteriormente se agregó 1 mL de ese medio a una placa de ADS estéril.
- Se puso un disco de antibióticos para bacterias Gram positivas en la placa y se dejó incubar hasta su crecimiento.
- Se marcó sobre la placa en donde se observó un halo de inhibición.
- Se repitió la técnica utilizando un disco de antibióticos para bacterias Gram negativas.

### 6.3.1 Análisis fenotípico

- Las bacterias por ser clasificadas se analizaron a través de un número grande de pruebas bioquímicas y morfológicas. En seguida se creó una matriz de datos en el programa Excel donde las propiedades positivas se registraron como "+" y las negativas como "-" como se muestra en la siguiente figura.

**Cuadro 6. Matriz de datos de las pruebas bioquímicas**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	-	+	+	+	+	+	-	-	+
2	+	-	+	+	-	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	+
6	-	-	+	+	+	-	+	+	-
7	+	+	+	+	-	+	-	-	+
8	+	-	+	-	+	-	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	-
10	-	-	+	-	+	+	+	+	-

- Cada una de las cepas se comparó con cada una de las restantes utilizando el programa NTSYS (Numerical Taxonomy System) el cual hace lo siguiente: las propiedades entre cada par de cepas en comparación se les estableció un valor numérico, las propiedades iguales en ambas cepas tuvieron valor de "uno" y las propiedades que no fueron iguales tuvieron valor "cero" (Serrano y Sandoval, 2005).

**Cuadro 7. Resultado posible de una prueba**

		Cepa 1	
		+	-
Cepa 2	+	a 1	b 0
	-	c 0	d 1

- El grado de semejanza fue determinado por el coeficiente de similitud simple (Ssm).

$$\%Ssm = \frac{\text{Número de caracteres compartidos}}{\text{Número total de caracteres}} \times 100$$

También puede expresarse como:

$$\%Ssm = \frac{(\Sigma a + \Sigma d)}{n} \times 100$$

Donde  $\Sigma a$  es el número de caracteres positivos (+) compartidos entre dos cepas,  $\Sigma d$  es el número de caracteres negativos (-) compartidos y  $n$  el número total de caracteres.

- A partir del Ssm se realiza una matriz de similitud no jerarquizada que posteriormente se organizará en grupos con base en el Ssm más alto, a esto se le denomina "Análisis de grupo".

**MATRIZ NO JERARQUIZADA**  
Coeficiente de similitud simple (Ssm)

1	100													
2	100	100												
3	100	100	100											
4	15	15	15	100										
5	15	15	15	100	100									
6	15	15	15	100	100	100								
7	15	15	15	100	100	100	100							
8	69	69	69	15	15	15	15	100						
9	69	69	69	15	15	15	15	100	100					
10	76	76	76	7	7	7	7	92	92	100				
11	76	76	76	7	7	7	7	92	92	100	100			
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Se compara entre cepas con base en su Ssm

**MATRIZ JERARQUIZADA**  
Coeficiente de similitud simple (Ssm)

1	100																
2	100	100															
3	100	100	100														
10	76	76	76	100													
11	76	76	76	100	100												
8	69	69	69	92	92	100											
9	69	69	69	92	92	100	100										
7	15	15	15	7	7	15	15	100									
5	15	15	15	7	7	15	15	100	100								
6	15	15	15	7	7	15	15	100	100	100							
4	15	15	15	7	7	15	15	100	100	100	100						
				1	2	3	10	11	8	9	7	6	5	4			

Figura 12. Matriz de semejanza entre cepas dependiendo de su Ssm.

- Cada cepa se extrajo de la matriz en el nivel más alto de similitud con cualquier otra cepa formado núcleos (*clusters*) de grupos, a esto se le llama "dendrograma".

- El dendrograma final nos permite analizar los datos obtenidos con las pruebas bioquímicas y resolver el problema de la clasificación con base en sus asociaciones o similitudes entre miembros del mismo o diferente *cluster*.

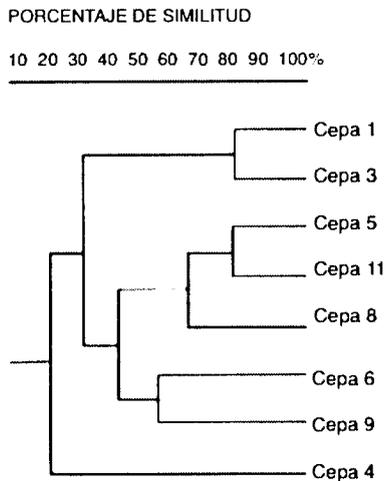


Figura 13. Ejemplo de dendrograma. Agrupación de las cepas a partir de las matrices jerarquizadas.

#### 6.4 Pruebas genéticas y filogenéticas

El gen 16S rRNA es de aproximadamente 1500 nucleótidos, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los procariontas. Su secuencia se encuentra altamente conservada, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen variaciones donde se concentran zonas específicas. La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontas. En microbiología clínica la identificación molecular basada en ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnica resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo (Serrano y Sandoval, 2005).

Extracción de ADN: Se llevó a cabo la extracción del ADN siguiendo el protocolo especificado por el fabricante del kit Promega Wizard® del laboratorio Genomic.

- Se resuspendió el botón de células con 480  $\mu$ L de EDTA 0.5 M
- Se adicionó 120  $\mu$ L de lisozima y mezcló cuidadosamente.
- La muestra se incubó a 37°C por 1 hora, se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos y removió el sobrenadante.

- 600  $\mu\text{L}$  de solución de lisis nuclear de paquete de purificación de ADN se agregó y mezcló.
- Se incubó a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente
- Se adicionó 3  $\mu\text{L}$  de solución de RNAsa y mezcló por inversión del tubo por 3 veces.
- Se incubó el tubo a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- 200  $\mu\text{L}$  de solución de precipitación de proteínas se añadió y agitó con vortex vigorosamente durante 20 segundos.
- Se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos.
- Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos y transferí el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio y estéril el cual contenía 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol
- Después se mezcló suavemente hasta que se observó la formación de hebras de ADN.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos
- Fue drenado cuidadosamente el tubo en papel absorbente, se adicionó 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y agitó varias veces el tubo delicadamente cuidando no despegar el pellet de ADN.
- Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 minutos, se eliminó cuidadosamente el etanol y se dejó secar al aire de 10 a 15 minutos.
- Finalmente, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de solución de rehidratación y fue colocado en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  por una noche.

b) **Amplificación del gen 16S rRNA:** Esta técnica se utiliza para conocer el género y especie de bacterias, debido a que está distribuido universalmente entre éstas, es estable, conservado y tiene una longitud adecuada (Clarridge, 2004). Para realizar la identificación de los microorganismos se utilizaron los siguientes "primers" o cebadores universales.

27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Land *et al.*, 1991).

1. La preparación para la PCR fue:

- 14.3  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$
- 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer
- 2.5  $\mu\text{L}$  de cada primer
- 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerasa (laboratorio BioLine)
- 3  $\mu\text{L}$  de ADN

2. Las condiciones del ciclo térmico para la amplificación del gen 16S rRNA fueron las siguientes.

- Pre-desnaturalización por 5 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ .
- Desnaturalización por 1 minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ .
- Alineamiento del cebador por 30 segundos a  $59^{\circ}\text{C}$
- Amplificación por 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$ .

- Elongación por 10 minutos a 72°C
- 30 ciclos

3. Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en el gel de agarosa al 1%

- Se pesó la agarosa y se midió el volumen correspondiente de solución TAE 1X, colocándolos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Se fue agitando suavemente y se calentó en el horno de microondas por aproximadamente 40 segundos hasta la disolución de todos los sólidos.
- Se armó la cámara de electroforesis horizontal y se agregó la agarosa sobre el molde, se dejó solidificar la agarosa y se retiró cuidadosamente el peine.
- Se tomó 5 µL de muestra y se mezcló con el buffer de carga colocando la mezcla en los pozos de la cámara cuidadosamente.
- Se colocó 3 µL del marcador de peso molecular (300-10000 pb, Trading New Technologies).
- Se cerró la cámara de electroforesis y se programa a 120 Volts y 300 µAmperes por 30 minutos.
- Colocamos el gel de agarosa en la cámara de tñido que contiene una solución de bromuro de etidio (BrEt), durante 40 segundos.
- Se transfirió el gel a la plancha del fotodocumentador, colocando la tapa y encendiendo la luz UV y la cámara fotográfica.
- Capturamos la imagen y guardamos el archivo.

4. Los fragmentos amplificados fueron enviados al servicio de secuenciación MacroGen en Maryland, Estados Unidos.

5. Identificación de especies: Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa BioEdit (Biological sequences alignment versión 7.2.5). Una vez corregidas las secuencias se generaron secuencias consenso las cuales se compararon en las bases de datos: EzTaxon y GenBank BLAST del NCBI, y así se realizó la identificación de las cepas.

#### **6.4.1 Análisis filogenético**

En el análisis filogenético, se estudia la historia evolutiva de un grupo de organismos. Como carecemos de un conocimiento directo del camino seguido por la evolución, la premisa es que las bacterias están relacionados por la herencia, y que la secuencia de un genoma bacteriano es un registro explícito de los ancestros de dicha bacteria. Como la evolución es un proceso de herencia del cambio nucleotídico, analizar las diferencias en la secuencia de ADN de distintas bacterias debe permitirnos reconstruir su historia filogenética (Madigan *et al.*, 2009).

I. Análisis filogenético: Se obtuvieron secuencias del GenBank del NCBI (Benson *et al.*, 2008) correspondientes a los géneros y especies con las que las cepas a identificar presentaron los porcentajes más altos de semejanza. Se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias con el programa BioEdit (Hall, 1999; 2011).

**Cuadro 8. Ejemplo de alineamiento de las secuencias.**

ORGANISMO	SECUENCIA
Cepa 1	CGARTCGCCTGACTGARTCGG
Cepa 1	CGATTCGCCTGACTGAGTCGG

- Se construyó el árbol filogenético por el método de máxima parsimonia con el programa MEGA (versión 6.0) (Kumar *et al.*, 2008). El método de máxima parsimonia en la reconstrucción filogenética tiene como objetivo la búsqueda e identificación de un posible árbol filogenético que requiera el menor número de eventos evolutivos. Los datos que se utilizan se recogen en una matriz que puede estar formada por secuencias de ADN previamente alineadas

Se utilizan las siguientes ecuaciones.

$$D: n \ln [n/(n-D)]$$

Donde D son las diferencias en  $n$  sitios, sirve para calcular el número de cambios posibles en los nucleótidos (Margoliash y Smith, 1965).

$$K_{nuc} = -3(3/4) \ln [1.0 - (4/3)\lambda]$$

Esta ecuación calcula la velocidad de nucleótidos sustituidos, donde  $\lambda$  es la fracción de diferentes residuos (Hori y Osawa, 1979). Estas correcciones tienen un mayor número de cambios estimados que cambios observados e intenta contar la variación de las secuencias no observables.

**Cuadro 9. Estimación de la distancia evolutiva**

<b>Distancia evolutiva</b>	<b>Distancia evolutiva correcta</b>
Cepa 1 —————> Cepa 2 0.25	0.30
Cepa 1 —————> Cepa 3 0.33	0.44
Cepa 1 —————> Cepa 4 0.42	0.61

- La estimación de la distancia de las ramas en el árbol se estima con el método de *Neighbor-joining*: Es un método basado en que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas. Para ello, a partir de un árbol en estrella, se determina la pareja de secuencias más cercanas y se unen mediante un nodo interno. Este proceso se repite con el resto de secuencias hasta que quedan todas unidas por nodos internos que minimizan la longitud de cada una de las ramas internas, aunque no se asegura una longitud mínima global. Con este método se obtiene un árbol no enraizado y aditivo, en el que la longitud de sus ramas indica cambio evolutivo (Serrano y Sandoval, 2005).

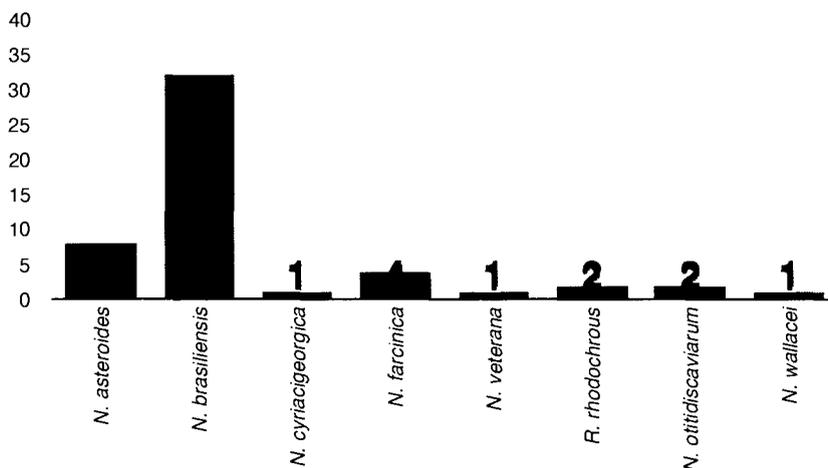
## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El estudio de cepas de actinomicetos es de gran importancia en diferentes ámbitos, el conocimiento general de éstos microorganismos aclara el panorama a la hora de ser utilizados en diferentes estudios.

El principal objetivo de este proyecto fue realizar una correcta identificación taxonómica de 51 cepas mediante técnicas fenotípicas y moleculares actuales y precisas, éstas cepas anteriormente habían sido identificadas con cinco pruebas bioquímicas y se pretendió comparar los métodos de identificación tradicional con el moderno.

El historial de cada cepa es imprescindible obtenerlo, a pesar de tener especies iguales de diferentes aislados, podemos encontrar diferencias en las pruebas realizadas y esto podría explicarse si estudiamos también el hábitat de donde se obtiene. Las cepas de suelo, agua, infecciones animales o humanas están expuesta a diferentes sustratos e interacciones con otros organismos, por lo que su adaptación a éstos ambientes puede determinar su variabilidad metabólica. Las cepas de este estudio son de origen clínico, sin embargo, sus características incluso de infección son diferentes. No se estudió su mecanismo de patogenicidad, pero la información obtenida sobre el tipo de infección y el tipo de pacientes nos ayuda a conocer mejor a la bacteria.

A pesar de no ser la única encontrada como agente patógeno, *N. brasiliensis* sigue siendo la que encontramos con mayor frecuencia en casos clínicos, de las 51 cepas, 32 cepas (62.74%) son de ésta especie, seguida por *N. asteroides* con 8 cepas identificadas (15.68%) por lo que se cree son las que tienen mayor capacidad de infectar o las que se encuentran en mayor concentración en el ambiente, En la gráfica podemos observar el número de casos de cada especie encontrada.



Gráfica 3. Número de especies encontradas en las cepas de estudio.

*N. wallacei* es una especie poco frecuente en infecciones, y al ser reciente su identificación, no se conoce ampliamente, en este estudio se encontró en un paciente con VIH, por lo que sigue un patrón de infección, como indica la literatura, se ha encontrado principalmente en pacientes inmunocomprometidos como es éste caso. Además, en la revisión, se buscaron infecciones de éste tipo y encontramos que es el primer caso en nuestro país por ésta bacteria, éste hallazgo cambia en primer lugar, la epidemiología de nuestro país, pues hasta hace pocos años, las infecciones de actinomicetos se le atribuían a *N. brasiliensis*, pero ya se sabe que también es provocada por otras especies aunque han sido menos reportadas, y ahora también se lo podemos atribuir a *N. wallacei* cuando tratamos a una población en específico, como son los pacientes con VIH, pacientes con tabaquismo o alcoholismo entre otras enfermedades (Conville *et al.*, 2008; Hamid *et al.*, 2013; Cooper *et al.*, 2014; Rajagopal *et al.*, 2016).

Por otra parte, el crecimiento de nuestras cepas, así como de la mayoría de los actinomicetos es muy lenta, las cepas crecieron en un periodo de 15 a 45 días, es un problema, ya que al tenerlas en incubación a 37°C el medio de cultivo empieza a deshidratarse antes de que la cepa empiece a crecer; una alternativa es usando placas de medio sólido muy gruesas o usando mayor cantidad de medio líquido de lo usual.

Debido a su crecimiento lento, hay que prestar atención a la contaminación que crece más rápido y que puede presentarse por la manipulación de las cajas Petri; antes de empezar las pruebas hay que estar 100% seguros de que las cepas se encuentran en estado puro. El crecimiento de los actinomicetos es uno de los principales motivos por lo que éstas bacterias no son muy utilizadas para su estudio comparado con otras bacterias, pues hay que esperar tiempo prolongado para su manipulación en cada prueba, pues siempre hay que utilizarlas en estadio temprano, también llamado estadio log.

En la vista microscópica pudimos observar que todas las cepas son células Gram positivas, es decir, que se tiñen de color violeta o morado con la tinción de Gram, característicos de todos los actinomicetos debido a la composición de su pared; las nocardias crecen en forma de hifas produciendo un micelio, algunas tienden a fragmentar en formas cocobacilares mientras envejece la colonia.

En dos cepas se observó que el crecimiento fue en forma de cocos, pero éstas cepas fueron identificadas como el género *Rhodococcus*, lo cual se entiende en su forma tanto microscópica como macroscópica. Anteriormente, los actinomicetos eran confundidos con los hongos ya que son muy similares al microscopio, desde su tinción hasta la forma de sus hifas, por eso, en muchos casos de infección el tratamiento era un antifúngico, lo que provocaba la cronicidad de la infección.

Fotografía microscópica

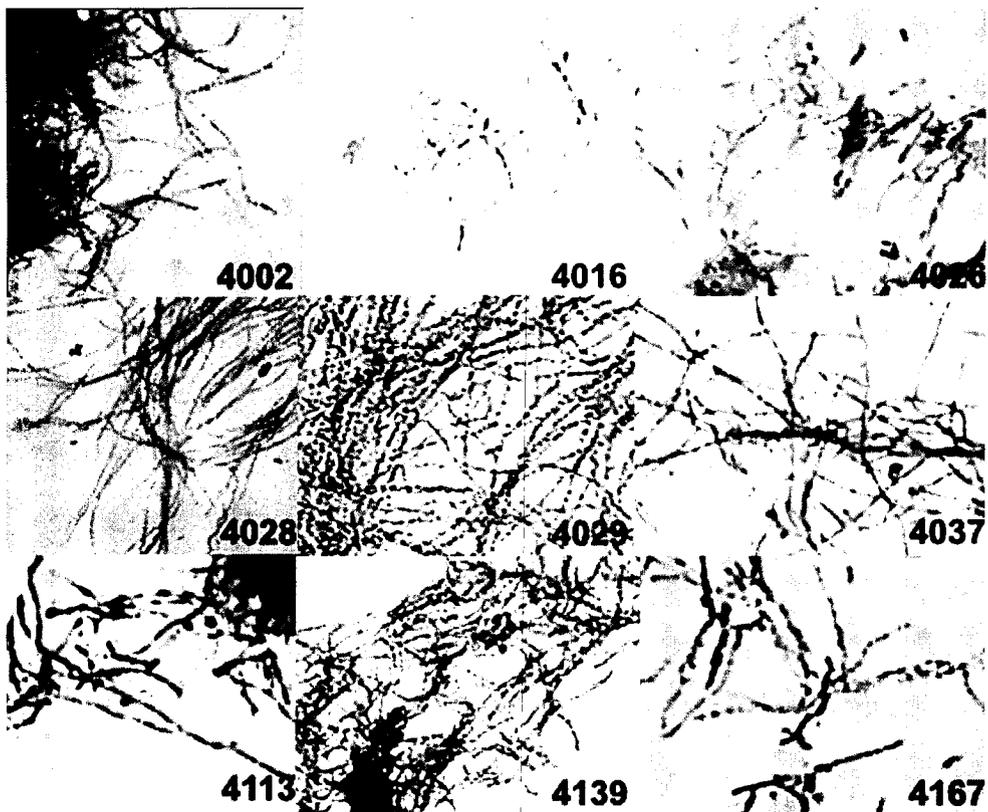


Figura 14. Microscopía de cepas de *Nocardia brasiliensis*. Todas las células tienen un crecimiento en forma de hifas.

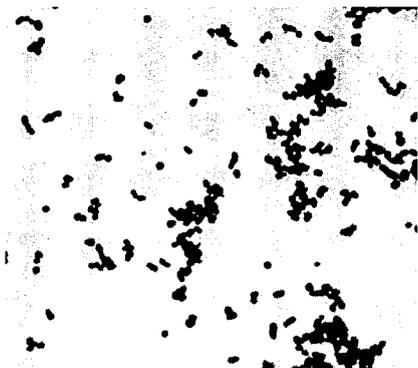


Figura 15. Microscopía de cepa de *Rhodococcus rhodochrous*. Las células tienen un crecimiento en forma de cocos.

En la vista macroscópica se utilizó un solo medio de cultivo para que no hubiera diferencias en los nutrientes que permitieran polimorfismo en las colonias. Pudimos observar mucha variabilidad, no sólo en la comparación entre cepas de diferentes especies; también encontramos variabilidad entre colonias de la misma especie. Para *N. cyriacigeorgica*, *N. veterana* y *N. wallacei* sólo hubo una cepa identificada de cada especie por lo que no se pudo determinar si existe un patrón de crecimiento. En *N. otitidiscaviarum* se observó que las cepas eran muy similares entre sí, sin embargo también encontramos que eran muy similares con otras especies. En cuanto a *N. brasiliensis*, *N. asteroides* y *N. farcinica* fueron los grupos con mayor número de cepas, pero que su crecimiento colonial no era un patrón que pudiera guiarnos para su identificación debido a su variabilidad, al igual que las dos cepas de *Rhodococcus*. Una característica que es similar entre todas las cepas es el color de la colonia, en el crecimiento temprano encontramos que el color es amarillo o anaranjado claro en todas las cepas; sin embargo, suele cambiar a anaranjado sucio, morado y café mientras envejece la colonia; también suelen obtener una superficie de aspecto polvoso de color blanco que es el micelio aéreo de las colonias. Por lo anterior, no podemos usar el aspecto colonial como patrón de identificación. Las siguientes fotografías fueron de cepas identificadas como *N. brasiliensis*.

#### Fotografía macroscópica

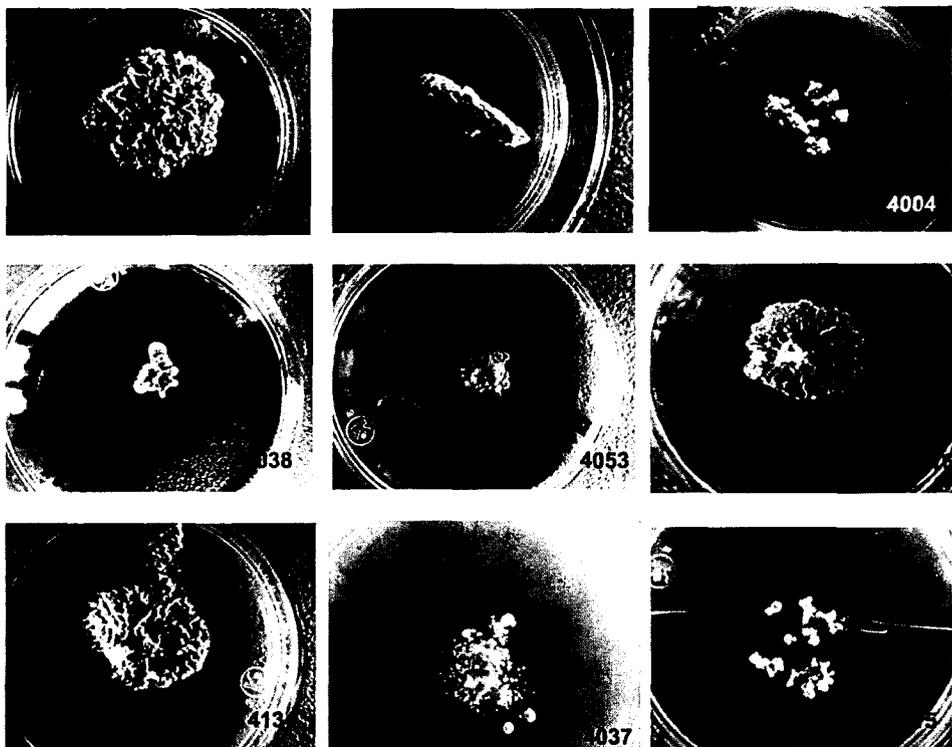


Figura 16. Crecimiento colonial de cepas de *Nocardia brasiliensis*. Se observan diferencias en color, forma y textura, a pesar de la misma especie.

Las pruebas bioquímicas nos permitieron conocer ampliamente a las cepas de estudio, con 130 pruebas pudimos conocer sus necesidades nutricionales, actividad enzimática, metabolismo de fermentación, reducción u oxidación y sensibilidad o resistencia a antibióticos.

Las pruebas automatizadas utilizadas son especialmente para la identificación de enterobacterias, y generalmente se usan en los laboratorios clínicos; por lo que debimos cambiar algunos parámetros para las necesidades de los actinomicetos. La solución McFarland que se utilizó se cambió a una concentración mayor a la especificada en el instructivo debido al crecimiento lento de la bacteria, pues suponemos que al aumentar la concentración de la suspensión, utilizamos mayor número de células jóvenes que permiten utilizar los sustratos de cada pocillo; por otra parte la lectura no se podía hacer únicamente en 24 horas como se indica, ya que a ese tiempo todavía no hay crecimiento de nuestras bacterias. Sin embargo, la lectura se hizo cada 24 horas durante 7 días, para poder determinar la lectura correcta.

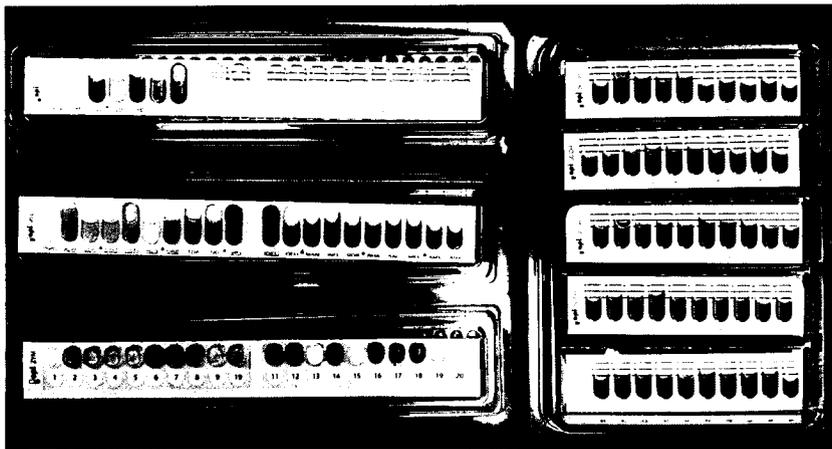


Figura 17. Ejemplo de las galerías. Resultado de las cuatro pruebas bioquímicas automatizadas a 72 horas de su realización e incubación.

Establecimos que el tiempo óptimo de lectura es a las 48, 72 y 96 horas, pues a esos tiempos, las bacterias jóvenes en crecimiento comienzan a utilizar los sustratos. A 48 y 72 horas hubieron mínimo 3 pruebas positivas que determinan el momento en que las bacterias comienzan su metabolismo y a utilizar los nutrientes, 96 horas es el tiempo extra que se da para los nutrientes de difícil o lenta asimilación, si hiciéramos la lectura después de 96 horas, observamos que los reactivos como el rojo de fenol (en la prueba API 50CH) comienzan a deteriorarse y en los pocillos observamos cambios de color de falsos positivos. También determinamos que la prueba API 50CH no es útil para identificación de nocardias de forma rutinaria en laboratorios de diagnóstico, pues de las 49 pruebas, únicamente la prueba de Esculina (prueba 25) da positivo para todos los actinomicetos empleados, y las demás pruebas dan negativo en más del 90% de los casos; además,

la prueba de esculina también se encuentra en la API 20NE, por lo que podemos desechar la API 50CH para evitar pérdida de dinero y tiempo.

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos nos enseñó que la sensibilidad es importante al momento de combatir a una especie específica, sin embargo, la sensibilidad también cambia de cepa en cepa (hay diferencias entre cepas ambientales y clínicas), y ésta prueba es importante realizarla siempre que se trate de un diagnóstico clínico, pues la cepa es resistente a antibióticos dependiendo del lugar donde es aislado o si el paciente ha sido expuesto a un antibiótico, no siempre es confiable los resultados de un laboratorio de referencia, pues la resistencia se debe a muchos factores a los que está expuesta cada cepa, como se ha visto en estudios anteriores y en la experiencia.



Figura 18. Ejemplo de la prueba de sensibilidad a antibióticos. Los halos de inhibición representan la sensibilidad de la cepa a el antibiótico que se encuentra en el disco blanco.

Gracias a la realización de 130 pruebas bioquímicas automatizadas realizadas a 51 cepas, podemos realizar un nuevo patrón de identificación a partir de las pruebas del laboratorio BioMérieux para nocardias, así como está establecido para las enterobacterias; ésta propuesta ayudaría a los laboratorios clínicos, evitando tiempo prolongado en la realización de diversas pruebas, también evitaría confusiones en el diagnóstico y tratamiento. Además, podemos comparar todos los resultados y establecer una nueva metodología que se utilice rutinariamente en laboratorios para identificación, que incluya pruebas diferentes a las usadas actualmente que pretendan ser mas específicas y poder separar entre especies de este género. Queda como un estudio posterior para ser analizado con detenimiento.

Las pruebas bioquímicas también nos sirven para hacer un dendrograma que agrupe a las cepas con características similares y nos ayudan a nombrarlas gracias a bases de datos especiales para esto.

Análisis fenotípico de las cepas de actinomicetos de la colección del Laboratorio de Producción de Biológicos

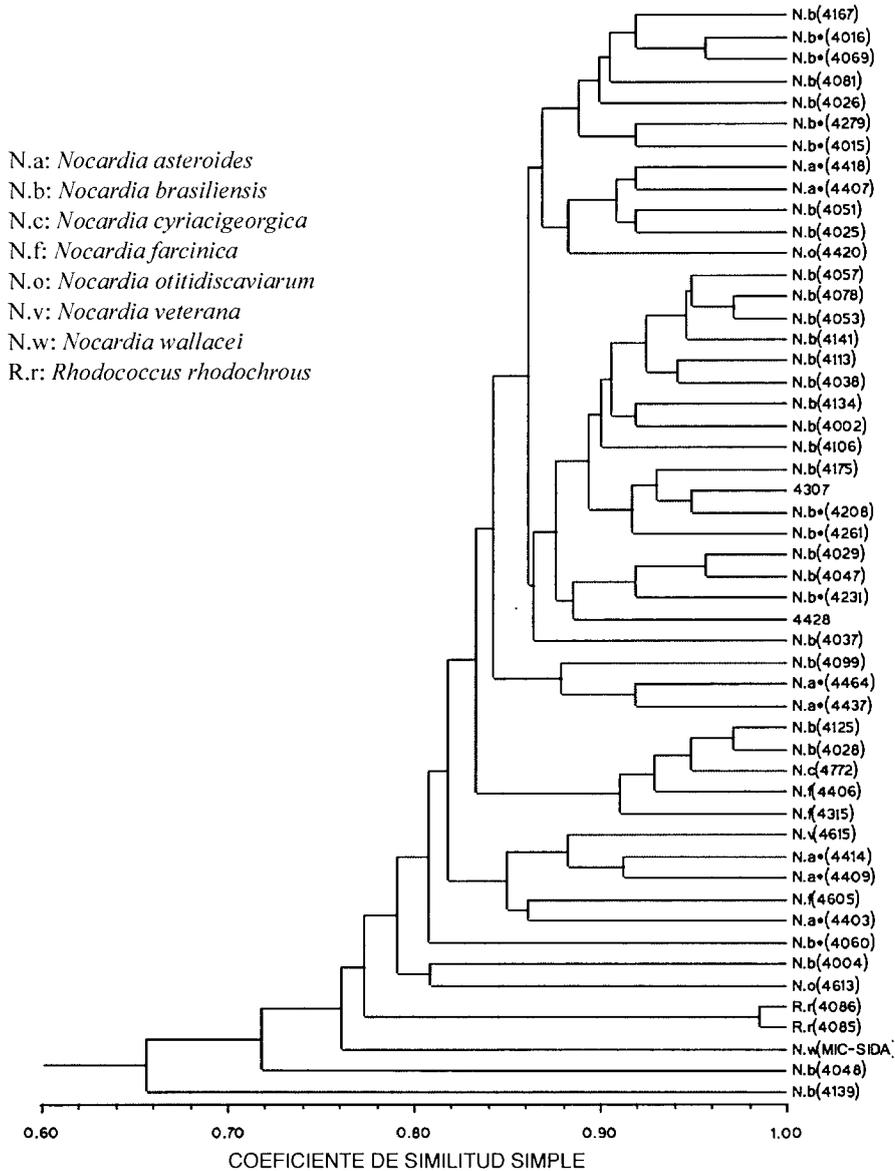


Figura 19. Dendrograma realizado con el programa NTSYS. Podemos observar la agrupación de las cepas dependiendo de su similitud con base en las 130 pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas nos sirven como base para la realización de estudios posteriores, por ejemplo, si necesitamos una cepa que utilice un hidrocarburo como nutriente nos sirve para remediación ambiental, o si necesitamos una cepa que produzca un metabolito o una enzima específica para combatir una plaga o generar un antibiótico u otro proyecto biotecnológico, o si queremos conocer la epidemiología o epizootiología; basta con abrir un catálogo de referencia para escoger una o varias cepas que nos ayuden a nuestro objetivo.

La tabla de los resultados completos obtenidos en las pruebas bioquímicas API y sensibilidad a antibióticos se incluyen en los anexos.

La prueba molecular 16S rRNA es muy importante en la taxonomía de procariontes, teniendo una cepa pura se puede conocer su secuencia que nos sirve para compararla con otras secuencias y así podemos darle un nombre para ubicar esa cepa en su respectivo taxón. Es un método rápido y muy preciso para identificar una bacteria, además podemos conocer la composición del ADN y saber el porcentaje de nucleótidos que la conforman.

Nuestras bacterias demostraron tener alto porcentaje de guanina y citocina, característico de los actinomicetos. Además metimos las secuencias en dos bases de datos diferentes y comparamos los resultados. Las 3 cepas identificadas en BLAST como *N. farcinica*, fueron nombradas como *N. kroppenstedtii* en NZTaxon, por lo que entramos en un problema de resolución, pues la diferencia de similitud en menor al 1% entre las dos especies en cada cepa haciendo que la diferencia sea de menos de 5 nucleótidos; al final se nombraron como *N. farcinica*, ya que la otra especie sigue en estatus de revisión como especie nueva, sin embargo, sería conveniente hacer uso de otro gen para comparar las cepas y determinar si existen diferencias en su genoma que pudiera abrir un nuevo cluster.

Por otra parte la cepa 4002 dio una identificación como *N. brasiliensis* en BLAST y como *N. altamirensis* en NZTaxon, la diferencia fue de 0.31% lo que representa 1 nucleótido de diferencia, al final se nombró como *N. brasiliensis* pues nos ayudamos de un árbol filogenético para ver que la cepa se agrupaba con otras cepas de esa especie. En todas las demás cepas hubo concordancia con ambas bases de datos, además todas se pudieron identificar hasta nivel de especie, algo que muchas veces no se puede hacer sólo con pruebas fenotípicas. Para el caso de las cepas 4085 y 4086 la prueba molecular sirvió para confirmar que son del género *Rhodococcus*, pues aunque la morfología colonial y celular mostraban que eran muy diferentes a las demás y podía tratarse de otro género, la identificación anterior que era tradicional la había identificado como *Nocardia sp.* Esta prueba es muy útil en el diagnóstico rápido, sin embargo, es más costosa que las pruebas bioquímicas tradicionales y se necesitan técnicos capacitados para su empleo. Además, las secuencias de nuestras cepas fueron enviadas y aceptadas en la base de datos del GeneBank, por lo que cualquier persona en el mundo puede acceder a ellas y utilizarlas como comparación o revisión con otros estudios.

En la siguiente tabla se muestra la identificación anterior con las pruebas tradicionales y la identificación molecular realizada en este estudio.

**Cuadro 8. Identificación previa y actual de las cepas de estudio**

CLAVE DE CEPA	ANTECEDENTES		IDENTIFICACIÓN MOLECULAR		
	HISTORIA CLÍNICA	IDENTIFICACIÓN ANTERIOR	BLAST	EZ TAXON	CLAVE EN GENE BANK
4002	Talón	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia altamirensis</i> 99.31%	KP025756
4772	SIN REGISTRO	SIN IDENTIFICACIÓN	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> 99%	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i> 99.53%	KP025742
4315	Lesión en la región axilar	SIN IDENTIFICACIÓN	<i>Nocardia farcinica</i> 100%	<i>Nocardia kroppenstedtii</i> 99.84%	KP025714
4141	SIN REGISTRO	SIN IDENTIFICACIÓN	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.85%	KP025732
4406	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia farcinica</i> 99%	<i>Nocardia kroppenstedtii</i> 99.25%	KP025746
4615	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia veterana</i> 99%	<i>Nocardia veterana</i> 99.63%	KP025729
4086	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 99%	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 99.78%	KP025709
4085	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 99%	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 99.41%	KP025711
4605	SIN REGISTRO	<i>Nocardia globerulata</i>	<i>Nocardia farcinica</i> 99%	<i>Nocardia kroppenstedtii</i> 99.71%	S/D
4420	SIN REGISTRO	<i>Nocardia caviae</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 99%	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 99%	S/D
4613	SIN REGISTRO	<i>Nocardia erithropolis</i>	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 99%	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 99.4%	KP025741
MIC-SIDA	SIN REGISTRO	SIN IDENTIFICACIÓN	<i>Nocardia wallacei</i>	<i>Nocardia wallacei</i>	S/D
4167	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.84%	KP025743
4081	M. torácico	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.56%	KP025737
4057	M. en brazo	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 100%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 100%	KP025735
4125	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.32%	KP025749
4026	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.92%	KP025748
4028	M. en pierna derecha	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.19%	KP025749
4134	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 100%	KP025750
4078	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.39%	KP025752
4037	M. torácico y pulmonar	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.77%	KP025753
4113	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.78%	KP025731

4038	M. torácico y pulmonar	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.7%	KP025762
4106	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.41%	KP025760
4029	M. en pie	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 100%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.55%	KP025761
4139	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.93%	KP025736
4004	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.62%	KP025739
4047	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.21%	KP025730
4053	M. en pie	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.7%	KP025740
4175	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.85%	KP025733
4418	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D
4414	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D
4409	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D
4403	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D
4307	SIN REGISTRO	SIN IDENTIFICACIÓN	SIN IDENTIFICACIÓN	SIN IDENTIFICACIÓN	S/D
4261	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4208	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4428	SIN REGISTRO	SIN IDENTIFICACIÓN	SIN IDENTIFICACIÓN	SIN IDENTIFICACIÓN	S/D
4279	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4016	M. en pie	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4015	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4069	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4051	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.93%	KP025744
4407	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D
4048	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4060	M. en pie	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4025	M. en pierna	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.92%	KP025759
4231	SIN REGISTRO	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	S/D
4099	M. en pie	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99%	<i>Nocardia brasiliensis</i> 99.32%	KP025757
4464	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D
4437	SIN REGISTRO	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Nocardia asteroides</i>	S/D

El análisis filogenético agrupa a las cepas dependiendo de la similitud en su secuencia del gen 16S rRNA (u otros genes utilizados). El árbol filogenético que se realizó nos sirvió como ayuda en la identificación, como en el caso de las cepas que no pudimos nombrar fácilmente, ya que las bases de datos utilizadas nos arrojaban resultados diferentes. Además nos ayuda a saber el camino evolutivo de cada cepa, al ver agrupadas algunas cepas sabemos que éstas evolucionaron hacia el mismo sentido y otras ubicadas en un grupo diferente evolucionaron en un sentido distinto y se ve reflejado en las diferencias de nucleótidos en su gen 16S rRNA. También observamos que algunos especies se separaban a pesar de ser la misma, como en el caso de *N. brasiliensis* y *N. farcinica* como se muestra en el árbol siguiente; pues pueden estar en grupos diferentes por la diferencia de sus nucleótidos en su gen, sin embargo, no hay diferencias significativas para nombrarlas como especie diferente.

A las cepas que fueron identificadas como *Rhodococcus rhodochrous* se agregaron en otro árbol comparándolos con otras especies del mismo género para saber si se agrupaban entre sí o se agrupaban con especies diferentes, y lo que obtuvimos se observa en el árbol filogenético siguiente.

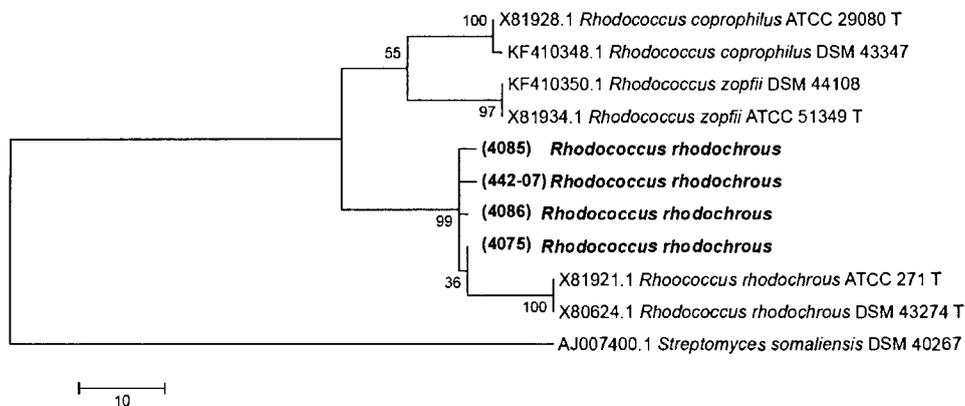
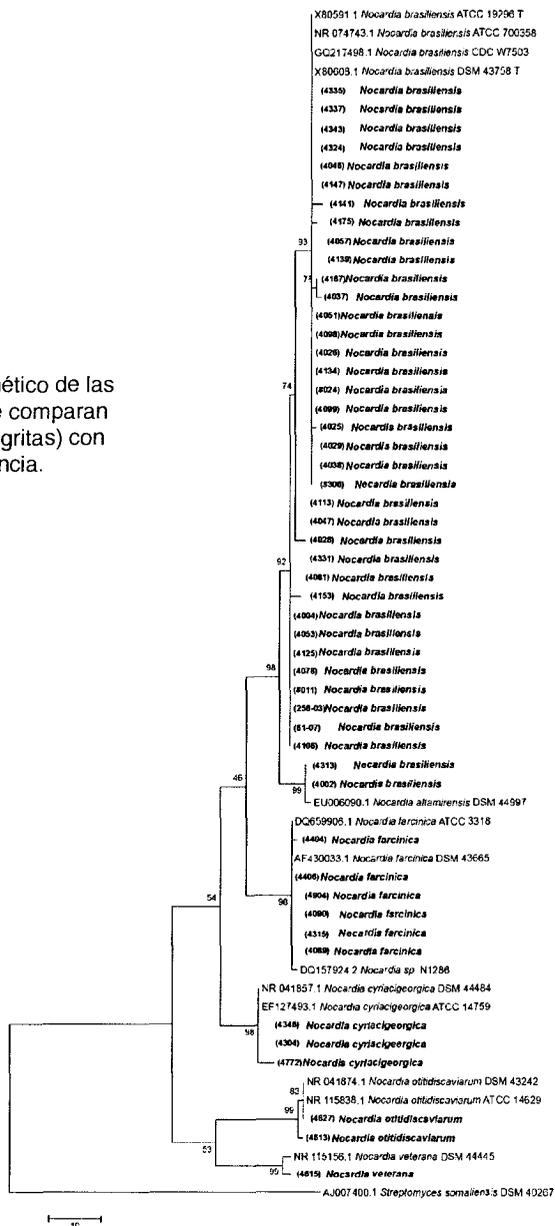


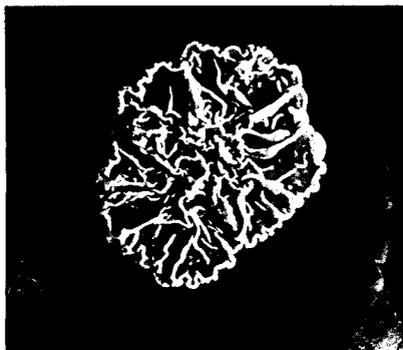
Figura 20. Árbol filogenético de las cepas de *Rhodococcus rhodochrous*. Se comparan nuestras cepas (4085, 4086) con cepas de referencia.

Figura 21. Árbol filogenético de las cepas de *Nocardia*. Se comparan nuestras cepas (en negritas) con cepas de referencia.



Por último, se realizó un catálogo con todas las cepas utilizadas en el estudio en donde podemos encontrar en forma de monografía las características de cada una de las pruebas realizadas por cepa, así cumplimos con el objetivo de la taxonomía: obtener, analizar, resumir y organizar la información de los organismos. Como ejemplo incluyo en la siguientes dos páginas la monografía de la cepa 4772 (*N. cyreacigeorgica*).

NOMBRE: *Nocardia cyriacigeorgica*  
CLAVE:4772



\*DESCRIPCIÓN:

Colonias de color crema-anaranjado pálido.  
Forma irregular, arrugadas y delgadas.  
Textura suaves.

\*PRUEBAS MOLECULARES

IDENTIFICACIÓN POR  
16S rRNA CON BLAST: *Nocardia cyriacigeorgica* SEMEJANZA: 99%  
CLAVE EN GEN BANK: KP025742

IDENTIFICACIÓN POR  
16S rRNA CON EZ TAXON: *Nocardia cyriacigeorgica* SEMEJANZA: 99.53%

PRIMERS UTILIZADOS: 27f:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'  
1492r:5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

LONGITUD DEL  
FRAGMENTO AMPLIFICADO: 1267 pb

\*PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Pruebas automatizadas **API 50 CH** del laboratorio bioMérieux son 49 ensayos bioquímicos que estudia la fermentación (producción de ácidos) de los hidratos de carbono y sus derivados.

Glicerol: **Negativo**  
Eritritol: **Negativo**  
D- arabinosa: **Negativo**  
L-arabinosa: **Negativo**  
D-ribosa: **Negativo**  
D-xilosa: **Negativo**  
L-xilosa: **Negativo**  
D-adonitol: **Negativo**  
Metil-βD-xilopiranosida:  
**Negativo**  
D-galactosa: **Negativo**  
D-glucosa: **Negativo**  
D-fructosa: **Negativo**  
D-mannosa: **Negativo**  
L-sorbosa: **Negativo**  
L-rhamnosa: **Negativo**  
Dulcitol: **Negativo**

Inositol: **Negativo**  
D-manitol: **Negativo**  
D-sorbitol: **Negativo**  
Metil-αD-Manopiranosida:  
**Negativo**  
Metil-αD-glucopiranosida:  
**Negativo**  
N-acetilglucosamina:  
**Negativo**  
Amigdalina: **Negativo**  
Arbutina: **Negativo**  
Esculina citrato férrico:  
**Positivo**  
Salicina: **Negativo**  
D-celobiosa: **Negativo**  
D-maltosa: **Negativo**

D-lactosa (origen bovino):  
**Negativo**  
D-melibiosa: **Negativo**  
D-sacarosa: **Negativo**  
D-trehalosa: **Negativo**  
Inulina: **Negativo**  
D-melezitosa: **Negativo**  
D-rafinosa: **Negativo**  
Almidón: **Negativo**  
Glicógeno: **Negativo**  
Xilitol: **Negativo**  
Gentiobiosa: **Negativo**  
D-turanosa: **Negativo**  
D-arabitol: **Negativo**  
L-arabitol: **Negativo**  
Gluconato potásico:  
**Negativo**

Pruebas automatizadas **API ZYM** del laboratorio bioMérieux son 19 ensayos

bioquímicos que permite detectar actividades

enzimáticas de un extracto complejo no purificado.

Fosfatasa alcalina: **Positivo**  
Esterasa (C4): **Positivo**  
Esterasa lipasa (C8): **Positivo**  
Lipasa (C14): **Negativo**  
Leucina arilamidasa: **Positivo**  
Valina arilamidasa: **Positivo**

Cistina arilamidasa: **Positivo**  
Tripsina: **Positivo**  
a-quimotripsina: **Positivo**  
Fosfatasa ácida: **Positivo**  
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa: **Positivo**  
a-galactosidasa: **Negativo**  
β-galactosidasa: **Positivo**

β-glucuronidasa: **Negativo**  
a-glucosidasa: **Positivo**  
β-glucosidasa: **Positivo**  
N-acetil-β-glucosaminidasa: **Positivo**  
a-mannosidasa: **Positivo**  
a-fucosidasa: **Negativo**

Pruebas automatizadas **API 20E** del laboratorio bioMérieux son 22 ensayos de asimilación de sustratos.

Ortonitrofenil-β-galactósido: **Negativo**  
Arginina: **Negativo**  
Lisina: **Negativo**  
Ornitina: **Negativo**  
Citrato sódico: **Negativo**  
Tiosulfato sódico: **Negativo**  
Urea: **Negativo**  
Triptófano (triptófano desaminasa): **Negativo**

Triptófano (producción de indole): **Positivo**  
Piruvato sódico: **Positivo**  
Gelatina de Kohn: **Negativo**  
Glucosa: **Negativo**  
Manitol: **Negativo**  
Inositol: **Negativo**  
Sorbitol: **Negativo**  
Ramnosa: **Negativo**  
Sacarosa: **Negativo**

Melibiosa: **Negativo**  
Amigdalina: **Negativo**  
Arabinosa: **Positivo**  
Producción de NO<sub>2</sub>: **Positivo**  
Reducción al estado N<sub>2</sub>: **Positivo**

Pruebas automatizadas **API 20NE** del laboratorio bioMérieux son 9 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación.

Nitrato potásico (reducción de nitratos en nitritos): **Positivo**  
L-triptófano: **Negativo**  
D-glucosa: **Negativo**  
L-arginina: **Negativo**  
Urea: **Negativo**  
Esculina-citrato férrico: **Positivo**

Gelatina (origen bovino): **Negativo**  
4-nitrofenil-βD-galactopiranosida: **Negativo**  
D-glucosa: **Negativo**  
L-arabinosa: **Negativo**  
D-manosa: **Negativo**  
D-manitol: **Negativo**  
N-acetil-glucosamina: **Negativo**

D-maltosa: **Negativo**  
Gluconato potásico: **Negativo**  
Ácido cáprico: **Negativo**  
Ácido adípico: **Negativo**  
Ácido málico: **Negativo**  
Citrato trisódico: **Negativo**  
Ácido fenilacético: **Negativo**  
Oxidasa: **Negativo**

El estuche de multidiscos BIORAD contiene los siguientes antibióticos.

Amikacina: **Resistente**  
Ampicilina: **Resistente**  
Carbenicilina: **Resistente**  
Cefalotina: **Resistente**  
Cefepime: **Sensible**  
Cefotaxima: **Sensible**  
Cefuroxina: **Resistente**

Cetriaxona: **Resistente**  
Cloranfenicol: **Resistente**  
Dicloxacilina: **Resistente**  
Eritromicina: **Sensible**  
Gentamicina: **Sensible**  
Levofloxacina: **Resistente**  
Netilmicina: **Sensible**

Nitrofurantoina: **Sensible**  
Pefloxacin: **Resistente**  
Penicilina: **Resistente**  
Tetraciclina: **Resistente**  
Trimetoprim-Sulfametoxazol: **Sensible**

\*DATOS DEL AISLAMIENTO:

Cepa aislada de paciente con micetoma en México. Sin identificación previa.

\*CONDICIONES DE CRECIMIENTO:

Sembradas en agar Dextrosa Sabouraud e incubada a 37°C hasta su crecimiento.

\*CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO:

En criotubo con 1 mL de medio líquido de Dextrosa Sabouraud con 20% de glicerol y almacenada a -20°C.

## 8. CONCLUSIONES

*N. brasiliensis* es una cepa que presenta mucho variabilidad en todas sus pruebas realizadas, al ver los clusters que se formaban planteamos dos hipótesis:

- *N. brasiliensis* es un complejo, a pesar de que ya se han sacado especies nuevas de aquí, aún no se ha separado lo suficiente éste grupo.
- *N. brasiliensis* es muy polimórfica, depende de su fuente de aislamiento lo que la hace que sea diversa, pero esto no significa que haya especiación.

*N. farcinica* sólo presentó variabilidad en la prueba molecular por lo que se plantean dos hipótesis:

- *N. kroppenstedtii* sí es una especie diferente a *N. farcinica*, por eso hay dos grupos que separan a ésta última especie en el árbol filogenético.
- *N. farcinica* tuvo cambios evolutivos en su genoma en diversas cepas que hacen grupos diferentes, pero no hay cambios suficientes para que se haga una especiación.

Para *N. cyreacigeorgica*, *N. veterana* y *N. wallacei* no formaron grupos numerosos, al ser cepas únicas de éstas especies, hicieron un *cluster* separado de otras cepas, obviamente por sus diferencias a nivel genoma. *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* y *R. rhodochrous* no tuvieron problemas con agruparse con cepas de su misma especie.

Nuestra colección de actinomicetos del laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM-X ha servido para muchos estudios a nivel Licenciatura y Posgrado, se han generado muchos proyectos de gran interés e importancia, entre los más destacados tenemos:

- Ser de los primeros laboratorios en México que agrega una colección de actinomicetos halófilos y que los ha estudiado ampliamente, conjuntamente con la Universidad del Estado de México.
- Ser pioneros en México en el estudio de actinomicetos ambientales y sus características.
- Identificar una nueva especie de actinomiceto llamada *Nocardia mexicana*, conjuntamente con la Universidad de Lyon, Francia.

Todas las pruebas en conjunto hacen un análisis taxonómico basto, hemos obtenido mucha información sobre éstas bacterias que ayudan a la ciencia, sin embargo, siempre es necesaria más información acerca de nuestro entorno biótico.

# ANEXOS

CLAVE DE CEPA	API 20E																					
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
4002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4772	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4406	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4615	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4420	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4613	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MIC-SIDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4081	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4057	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4026	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4078	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CLAVE DE CEPA	API 20E																					
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
4113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4418	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4409	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4261	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4428	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4279	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4069	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CLAVE DE CEPA	API 20E																					
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
4051	-	-	-	-	■	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4407	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4048	-	-	-	-	-	-	■	-	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4060	-	-	-	-	-	-	■	■	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4025	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4231	■	-	-	-	■	-	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4099	-	■	-	-	■	-	-	■	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	■
4464	-	-	-	-	■	-	■	■	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4437	-	-	-	-	■	-	■	■	-	■	■	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-





CLAVE DE CEPA																										4015
-																										4069
-																										4051
-																										4407
-																										4048
-																										4060
-																										4025
-																										4231
-																										4099
-																										4464
-																										4437







CLAVE DE CEPA	DIGN																			
	GE	LI	GLI	AD	FR	CO	CA	CC	CH	AR	MP	MA	MG	VAL	CR	GT	MAE	MIP	GD	PAC
4002		-	-	-						-	-	-		-	-	-				-
4141		-	-	-			-			-	-	-		-	-	-				-
4772		-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4315	-		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4406	-		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4615	-		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4086			-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-
4085			-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-
4605	-	-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4420		-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-			-	-
4613	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-			-	-
MIC-SIDA		-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-				-
4167	-		-	-	-		-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4081		-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4057		-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4125	-		-	-	-		-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4026		-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-	-	-			-	-
4028	-		-	-	-		-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4134		-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4078		-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-			-	-
4037		-	-	-			-			-	-	-	-	-	-	-			-	-



CLAVE DE CEPA	ADICION																			
	NO.	ED	GER	ADP	RE	SE	GR	AND	GU	AY	IN	MA	NAG	MA	GU	GA	AD	MHT	GT	PAC
4051	-	-	-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4407			-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
4048			-	-	-												-	-	-	-
4060			-	-	-												-	-		-
4025			-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-		-	-
4231			-	-	-				-	-		-		-	-	-	-	-	-	-
4099	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
4464	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4437			-	-	-				-	-	-	-	-	-		-			-	-

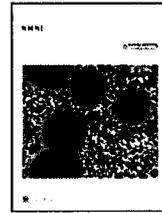
CLAVE DE CEPA	AK	AM	CB	CF	CTX	GRO	CL	GE	NET	NE	PEP	SXT	AM	CF	CTX	FEP	CXM	DC	E	GE	LEV	PE	TF	SXT
4002	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4141	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4772	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4315	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4406	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4615	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4086	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4085	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4605	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4420	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4613	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MIC-SIDA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4167	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4081	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4057	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4125	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4026	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4028	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4134	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4078	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4037	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

ANTIBIOGRAMA

CLAVE DE		ANTIBIOGRAMA																							
AK	AM	CB	CF	CTX	CRO	CL	GE	NET	NE	PEF	SXT	AM	CF	CTX	FEP	CXM	DC	E	GE	LEV	PE	TE	SXT		
4113	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
4038	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S
4106	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
4029	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
4139	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
4004	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
4047	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4053	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4175	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
4418	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4414	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4409	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4403	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4307	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4261	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4208	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4428	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4279	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4016	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4015	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4069	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

CLAVE DE CEPA	ANTIBIOGRAMA																								
	AK	AM	CB	CF	CTX	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT	AM	CF	CTX	FEP	CXM	DC	E	GE	LEV	PE	TE	SXT	
4051		R	R	R	R	R	R	R				R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			R
4407		R	R	R	R	R		R				R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
4048	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
4060		R		R		R					R		R	R		R	R	R						R	
4025	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			R
4231	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
4099		R	R	R	R	R		R			R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
4464		R	R	R	R	R					R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R		R
4437		R	R	R	R	R		R			R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R		R

# Accepted Manuscript



First case of isolation of *Nocardia wallacei* reported in Mexico

Janette González-Nava, Karina Sánchez-Herrera, Ninfa Ramírez-Durán, Horacio Sandoval

PII: S2052-2975(16)30099-3  
DOI: 10.1016/j.nmni.2016.09.009  
Reference: NMNI 230

To appear in: *New Microbes and New Infections*

Received Date: 15 June 2016  
Revised Date: 13 September 2016  
Accepted Date: 19 September 2016

Please cite this article as: González-Nava J, Sánchez-Herrera K, Ramírez-Durán N, Sandoval H, First case of isolation of *Nocardia wallacei* reported in Mexico, *New Microbes and New Infections* (2016), doi: 10.1016/j.nmni.2016.09.009.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Ms. Ref. No.: NMNI-D-16-00092R1  
Title: First case of isolation of *Nocardia wallacei* reported in Mexico  
New Microbes and New Infections

Dear Dr. Sandoval,

I am pleased to inform you that your paper "First case of isolation of *Nocardia wallacei* reported in Mexico" has been accepted for publication in *New Microbes and New Infections*.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to *New Microbes and New Infections*.

Yours sincerely,

Michel Drancourt, MD, PhD  
Editor in Chief  
*New Microbes and New Infections*

Comments from the editors and reviewers:

\*\*\*\*\*

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.



First Clinical Case Report

## First case of isolation of *Nocardia wallacei* reported in Mexico

Janette González-Nava<sup>1</sup>, Karina Sánchez-Herrera<sup>1</sup>, Ninfa Ramírez-Durán<sup>2</sup>, Horacio Sandoval<sup>1\*</sup>  

+ **Show more**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmni.2016.09.009>

Get rights and content

Under a Creative Commons license

First case of isolation of *Nocardia wallacei* reported in Mexico

Janette González-Nava<sup>1</sup>, Karina Sánchez-Herrera<sup>1</sup>, Ninfa Ramírez-Durán<sup>2</sup> and Horacio Sandoval<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100 Col. Villa Quietud C.P. 04960, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico.

\*Corresponding Author. E-mail: [hsandov@correo.xoc.uam.mx](mailto:hsandov@correo.xoc.uam.mx)

---

## Abstract

*Nocardia* species are aerobic, gram positive bacteria with branched filaments reported as opportunistic microorganisms associated to skin infectious diseases. This is the first report of isolation of *N.wallacei* in Mexico from a 43 years old male, construction worker, HIV positive, presenting a breathing failure with abundant sputum.

**KEY WORDS:** Nocardiosis, *Nocardia wallacei*, HIV, sputum.

## Introduction

*Nocardia* species are ubiquitous in the environment as saprophytic bacteria. *Nocardia* genus is aerobic, gram positive and branched bacteria that have the potential to cause localized or disseminated infection (1). A major risk factor for nocardia infection is being immunocompromised, specifically those with cell-mediated immunity defects, including HIV patients (2). Although the incidence and prevalence of the disease is not known; a 2013 study showed that of 8763 cases, reported since 1956, 30% (2607 cases) were in Mexico, 29% (2555 cases) in Sudan and 16% (1392 cases) in India, however there are data that strongly suggest that the real disease burden is probably more important than indicated in this meta-analysis (3). The majority of nocardiosis cases are caused by the *N.asteroides* complex and *N.brasiliensis* (4). This is the first report of isolation of *N.wallacei* in a patient male with HIV-AIDS and pulmonary failure in Mexico.

## Materials and methods

**Organism.** The strain was obtained from the General Hospital "Dr. Manuel Gea González" identified as *Nocardia sp.* The patient was a 43 years old male, construction worker, HIV positive, pre-

presenting a breathing failure with abundant sputum. The strain was grown at 37°C in BHI medium (Bioxon) for 7 days, and it was coded as “Mic-SIDA” strain.

Phenotypic identification: Colonies morphology and gram stain were determinate; 13 tests of acid production from several substrates and antibiotic sensitivity were performed (Table 1). The comparison of Mic-SIDA strain was made using biochemical tests of *N.wallacei* (ATCC 49873<sup>1</sup>), against a clinical isolated strain of *N.wallacei* and *N.transvalensis* (ATCC 6865<sup>T</sup>) strain (5).

Gene sequencing. DNA extractions were performed by kit Promega Wizard® following the instructions of the manufacturer (Laboratory Genomic). Amplification of the 16S rRNA sequence was carried out using the polymerase chain reaction (PCR) method. The primers used were: 8f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (6).

The amplification was performed using the kit BioLine. The parameters of reaction were: 30 cycle; pre-denaturation 5 minutes at 94°C; denaturation 60 seconds at 94°C; annealing 30 seconds at 59°C; extension 60 seconds at 72°C; finally, the extension post-amplification 10 minutes at 72°C. The products were sequenced in MacroGene Laboratory (Maryland, USA) and compared with the corresponding Gen Bank and NZ-Taxon registered sequences.

## Results

Colonies were white with a dusty appearance and irregular borders. The strain was gram positive, highly branched with large filaments and further fragmentation to rods and coccobacilli. The biochemical analysis indicated similarities with *N.wallacei* type strain but not with *N.transvalensis* species, as showed in Table 1.

The 16S rRNA gene sequencing (1354 bp) gives a 99.17% homology towards *N.wallacei* (ATCC49873<sup>1</sup>) in GeneBank-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; NCBI, Bethesda, MD) and 98.66% in EZ-Taxon (8); but, the gene sequencing gives a 97.94% of similarity to

*N.transvalensis* (ATCC6865<sup>T</sup>) in GeneBank (BLAST) and 97.82% compared in NZ-Taxon data bases.

*N.wallacei* species is not well known and causing rare infections, (8) so its identification in clinic can be complicated; however, with the joint analysis of biochemical and molecular tests is possible to obtain accurate identification.

	Mic-SIDA strain	<i>Nocardia transvaliensis</i> ATCC 6865 <sup>†</sup>	<i>Nocardia wallacei</i> ATCC 49873 <sup>†</sup>	<i>Nocardia wallacei</i> Clinic isolate
Arabinose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-
D-sorbitol	-	+	-	-
Trehalose	+	+	+	+
D-xylose	-	-	-	-
D-mannitol	-	+	-	-
D-glucose	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+
Casein	-	-	-	-
Antibiotic Sensitivity				
Amikacin	R		R	R
Ceftriaxone	S		S	S
Trimethoprim-sulfamethoxazole	S		S/R	S/R

Table 1. Comparison of biochemical tests and antibiotic sensitivity between strain Mic-SIDA and reference strains (adapted from (5))

## Bibliography

- (1) Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 2006; 19:259-82.
- (2) Benes J, Viechova J, Picha D, Horova B, Zatloukal P. Disseminated *Nocardia asteroides* infection in an immunocompetent woman following an arm injury. Infection 2003;31: 112-4.
- (3) The International Society for Neglected Tropical Diseases. Mycetoma. The case for a new entrant to the WHO's list of Neglected Tropical Diseases (NTDs). 2016. (Accessed May 20, 2016, at <http://www.isntd.org/#/isntd-disease-briefs/4592435414>).
- (4) Smeets LC, Van Agtmael MA, Van der Vorm ER. Successful treatment of a disseminated *Nocardia brasiliensis* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24:350-1.
- (5) Conville PS, Brown MJ, Steigerwalt GA, Brown-Elliott AB and Witebsky GF. *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., Human Pathogens and Members of the "*Nocardia transvalensis* Complex". J Clin Microbiol 2008b; 46:1178-1184.
- (6) Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons; 1991. pp. 115–175.
- (7) Chung J, Lee J, Kim M, Kim S, Kim B, et al. EzTaxon: a web based tool for the identification of prokaryotes based on 16 S ribosomal RNA gene sequences. Int. J. Syst. and Evol. Microbiol. (2007)
- (8) Hamid, M.E., Al Azraqi,,Martin R. J. and Al-Akami, A.M. Isolation of rare *Nocardia wallacei* from an HIV-positive patient with pulmonary infection in southern region of Saudi Arabia. Saudi Med. J. (2013), Vol (34) 6

## 10. REFERENCIAS

1. Acosta T, y Perez O. Dermatophilus congolensis in goats and its treatment with oxytetracycline at Yucatan State. Case report. Reunion Nacional de Investigacion Pecuaría; Guadalajara. AGRIS: CENID Microbiología, 2003. [acceso 12 de septiembre de 2015] Disponible en: [agris.fao.org](http://agris.fao.org)
2. Aiello y Susan E. El Manual Merk de Veterinaria; 2000 [acceso 25 de mayo de 2016] Disponible en: <http://catalogosuba.sisbi.uba.ar/vufind/Record/201603170441122508/Details#tabnav>
3. Barry S. Micetoma. Rev.Argent. Dermatol. 2009; 90:50-62.
4. Beaman BL, Beaman L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev 1994; 7:213-264.
5. Ben-Omar N, Merroun ML, Arias-Peñalver JM, y Gonzalez-Muñoz MT. Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. Chemosphere. 1997; 35(10):2217-2283.
6. Berliner R, y Torrey JG. On tripartite *Frankia*-mycorrhizal associations in the *Myricaceae*. Can J Bot. 1989; 67:1708-1712.
7. Bignell DRD, Francis I, y Loria R. Thaxtomin A production and virulence are controlled by several *bld* gene global regulators in *Streptomyces scabies*. Molecular Plant Microbe Interactions, 2014; 27 (8): 875-885.
8. Bolon B, Buergelt C, y Cooley A. Abortion in two foals associated with *Nocardia* infection. Veterinary pathology, 1998; 26(3):277-8.
9. Bou Aoun R, Hetru C, Troxler L, Doucet D, Ferrandon D, Matt N. Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. J. Innate Immun. 2011; 3(1): 52-64.
10. Bretschneider G. 2009. Beneficios del uso de monensina en la alimentación del ganado para carne, leche y cría. Revista electrónica de Veterinaria. 10(10). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100904.pdf>
11. Burbano H. El suelo: una visión sobre sus componentes biogénicos. 1a ed. Editorial Universidad de Nariño, 1989; 447 pág.
12. Cooper CJ, Said S, Popp M, Alkhateeb H, Rodríguez C, Porres M, y Alozie O. A complicated case of an immunocompromised patient with disseminated nocardiosis. Infectious Disease reports, 2014; 6(5327): 9-12.
13. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(4):840-62.
14. Cline J, Schlafer D, Callihan D, Vanderwall D, y Drazek FJ. Abortion and granulomatous colitis due to *Mycobacterium avium* complex infection in a horse. Vet Pathol. 1991;28(1):89-91.
15. Collins M, Hoyles L, Hutson RA, Foster G, y Falsen E. *Corynebacterium testudinoris* sp. nov., from a tortoise, and *Corynebacterium felinum* sp. nov., from a Scottish wild cat. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2001; 51(4):1349-52.

16. Condas L, Ribeiro M, Yazawa K, Castagna A, Salerno T, Giuffrida R, Langoni H, Melville P, Biesdorf S, Matsuzawa T, Gonoï T, Kastelic J, Barkema H. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil. Elsevier. Veterinary Microbiol. 2013; 167:708-712.
17. CONPAPA. 2010. XIII Congreso Nacional de Papa.
18. Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Brown-Elliott BA, Witebsky FG. *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., human pathogens and members of the “*Nocardia transvalensis* Complex” J Clin Microbiol. 2008; 46(4):1178–1184.
19. Currie CR, Scott JA, Summerbell RC y Malloch D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. Nature, 1999; 398(6729): 701-704.
20. Dávila M, Gallegos G, Hernández F, Ochoa Y, y Flores A. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatogénicos de importancia agrícola. Rev. Mex. Cienc. Agríc, 2013; 4(8):1187-119.
21. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo por el que se establecen las medidas de mitigación de riesgo para la importación de tubérculo de papa a los Estados Unidos Mexicanos. 2014.
22. Dimkpa C, Svatoš A, Merten D, Büchel G, y Kothe E. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. Canadian Journal of Microbiology, 2008; 54:163–172.
23. Domenis L, Pecoraro P, Spedicato R, Corvonato M, Peletto S, y Zuecon F. *Nocardia otitidiscaviarum* pneumonia in an Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). Journal of comparative pathology, 2009; 141(1):70-3.
24. Evangelista-Martínez Z, y Moreno-Enríquez A. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. Biotecnología. 2007; 11 (3):37-50.
25. Forshaw D, y Phelps G. Tuberculosis in a captive colony of pinnipeds. Journal of wildlife diseases, 1991; 27(2):288-95.
26. González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, y Genilloud O. Actinomyces isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiol Ecol, 2005; 54, 401–415.
27. Graham, P. y Harris S. Biological nitrogen fixation, 1982; 768 pp.
28. Hall TA. BioEdit: An important software for molecular biology. 2011.
29. Hamid ME, Al Azraqi TA, Joseph MR, y Al-Hakami AM. Isolation of a rare *Nocardia wallacei* from an HIV-positive patient with pulmonary infection in southern Saudi Arabia. Saudi Med J, 2013; 34 (6): 644-647.
30. Helie P, y Higgins R. *Mycobacterium avium* complex abortion in a mare. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 1996; 8(2):257-8.
31. Henricson B, Segarra M, Garvin J, Burns J, Jenkins S, y Kim C. Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* associated with an equine wound infection. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 2000; 12(3):253-7.
32. Hong C, Donahue J, Giles R, Petrites-Murphy M, Poonacha K, y Roberts A. Equine

33. abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 foaling seasons. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 1993; 5(4):560-6.
34. Hori H, y Osawa S. Evolutionary change in 5S RNA secondary structure and a phylogenetic tree of 54 5S RNA species. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979; 76:381-385.
35. Isik K, Chun J, Hah Y, y Goodfellow M. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *International journal of systematic bacteriology*, 1999; 49(2):833-7.
36. Kaltenpoth M, Goettler W, Dale C, Stubblefield JW, Herzner G y Roeser-Mueller K. "*Candidatus Streptomyces philanthi* " an endosymbiotic streptomycete in the antennae of *Philanthus digger* wasps. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 2006; 56: 1403-1411.
37. Kock N, Kock R, Wambua J, Kamau G, y Mohan K. *Mycobacterium avium* related epizootic in free-ranging lesser flamingos in Kenya. *Journal of wildlife diseases*, 1999; 35(2):297-300.
38. Kumar J, Tripathi BN, Kumar R, Sonawane GG, y Dixit SK. Rapid detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in clinical samples from sheep. *Tropical animal health and production*, 2013; 45(6): 1429-35.
39. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008; 9:299-306
40. Lacey J. Actinomycetes in soils, composts and fodders in Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. Academic Press, Londres, Inglaterra. 1973; 231–251 pp.
41. Lairmore M, Spraker T, y Jones R. Two cases of tuberculosis in raptors in Colorado. *Journal of wildlife diseases*, 1985;21(1):54-7.
42. Land G, McGinnis MR, Staneck J, y Gaston A. Aerobic pathogenic *Actinomycetales*. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, D.C.:American Society for Microbiology. 1991; 357 pp.
43. Leyva-Mir S, Garay-Lizárraga F, Alvarado-Gómez O, Castillo-Márquez L, Tovar-Pedraza J. Detección y control de *Streptomyces scabies* Lambert y Loria en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Valle de Mayo, Sonora, México. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 2014; 30(1): 5-13.
44. Loeffler. Actinomycetes as plant pathogens. *European journal of plant pathology*, 1994; 100: 179-200.
45. Logan NA, y Berkeley RCW. Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J Gen Microbiol*, 1984; 130:1871–1882.
46. López-Martínez R, Méndez-Tovar L, Bonifaz A, Arenas R, Mayorga J, Welsh O, *et al*. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gaceta Médica de México*. 2013; 149:586-92.
47. I.PSN: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2016. [acceso 25 de mayo de 2016] Disponible en: <http://www.-bacterio.net>
48. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, y Clark DP. Brock. *Biología de los microorganismos*. 12a ed., Pearson Educación S.A. editorial, 2009; 1259 pp.

49. Margoliash E, y Smith EL. Structural and functional aspects of cytochrome c in relation to evolution, in *Evolving Genes and Proteins*. Academic Press New York. 1995; 221-242 pp.
50. Martin A. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editores. Ciudad de México. 1981;158 pp.
51. Mas A, Sanes JM, MartínezF, Pallarés FJ, Bernabé A, y Seva J. Actinomicosis maxilar con obstrucción de cavidad nasal en un toro de Lidia. *An. Vet. (MURCIA)*, 2008; 24: 103-108.
52. McGavin M y Zachary J. *Pathologic basis of veterinary diseases*. 4th ed. USA: Mosby Inc. 2007; 1551 pp.
53. Macneill AC. Evidence of *Nocardia sp.* in a captive-born beluga whale. *Animal Pathology Laboratory*,1997; 50-3 pp.
54. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 1994; 7:357-417.
55. Moncada M, y Callejas G. *Dermatophilus congolensis* isolation from an exudative dermatitis in equines in Mexico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 1988.[acceso 20 de julio de 2015] Disponible en: [www.agris.fao.org](http://www.agris.fao.org)
56. Murakami S, Azuma R, Koeda T, Oomi H, Watanabe T, y Fujiwara H. Immuno-histochemical detection for *Actinomyces sp.* in swine tonsillar abscess and granulomatous mastitis. *Mycopathologia*, 1998; 141(1):15-9.
57. Muscatello G, Anderson GA, Gilkerson JR, y Browning GF. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Applied and environmental microbiology*, 2006;72(9):6152-60.
58. Oakey J, Forbes-Faulkner J, Gilpin C, Murdoch B, y Johnson S. Pyogranuloma caused by *Mycobacterium asiaticum* infection in a steer. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. 2005; 17(4):378-82.
59. OMC: Organización Mundial de Comercio. Acuerdo sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias. 1994
60. Padilla BJ, Arcipreste NC, Perez JT, Hurtado FA, Garcia DJ, y Anda VJ. Biotypes different of *Corynebacterium pseudotuberculosis* are involved in the Cutaneous and Visceral Caseous Lymphadenitis. *RECVET- Revista Electrónica de Clínica Veterinaria*. 2008. [acceso 24 de julio de 2015] Disponible en: [www.veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)
61. Paul AE, Mansfield C, y Thompson M. Presumptive *Nocardia spp.* infection in a dog treated with cyclosporin and ketoconazole. *New Zealand veterinary journal*, 2010; 58(5):263-8.
62. Poonacha KB, y Donahue JM. Abortion in a mare associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 1995; 7(4):563-4.
63. Prescott LM. *Microbiology*. 5th ed. Editorial McGraw-Hill. Boston, Massachusetts, USA, 2002; 524- 528pp.
64. Priest F, y Austin B. *Modern Bacterial Taxonomy*. Chapman & Hall, London. 1993.

65. Rajagopal S, Oliver N, Palau L, Plamenac J, y Mejía R. Invited Commentary on treatment of *Nocardia wallacei* in a HIV Patient with renal failure. *Curr Trop Med Rep*, 2016; 3(2) 67-70.
66. Ramos JA. Nocardiosis en un perro. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales*, 1990; 10(3): 157-62.
67. Ribeiro MG, Salerno T, Mattos-Guaraldi AL, Camello TC, Langoni H, y Siqueira A. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2008; 50(3):177-85.
68. Rodriguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P y Laurent F. *Nocardia mexicana* sp. nov. A new pathogen isolated from human mycetomas. *J. Clin Microbiol* 2004; 42(10): 4530-4535.
69. SAGARPA. 2002. Segundo informe de labores.
70. SAGARPA. 2009. Vacas sanas. negocio rentable.
71. SAGARPA. 2010. El Sistema Producto Papa en Michoacán. Bases y Estrategias para Mejorar su Competitividad.
72. SAGARPA. 2012. Fortalecidos controles zoonosarios en Quintana Roo.
73. SAGARPA. 2014. Querétaro, México. Comunicado de prensa.
74. Sánchez-Ovalle M, Sánchez-Peña S, Gallegos-Morales G, Sánchez-Arizpe A. Actividad Inhibitoria de Actinomicetos aislados de Hormigas Cultivadoras de Hongos (*Hymenoptera: Formicidae*) sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*. *Rev. Agraria Nueva Epoca*, 2011; 8(1):132-139.
75. Sarmiento-Vizcaíno A, González V, Braña A, Molina A, Acuña JL, García LA, y Blanco G. *Myceligenans cantabricum* sp. nov., a barotolerant actinobacterium isolated from a deep cold-water coral. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015; 65:1328–1334.
76. SENASICA. Fase de Erradicación en Tuberculosis Bovina. 2012.
77. Serrano y Sandoval. Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos. 1a de. Publicaciones del Vicerrectorado Académico, Colección de Ciencias de la Salud. Universidad de los Andes, Venezuela. 2005; 251 pp.
78. Serrano JA, Sandoval AH, y Beaman BL. Actinomicetoma. México: Editorial Plaza y Valdés, S.A. 2007; 35-88 pp.
79. Soldati G, Lu ZH, Vaughan L, Polkinghorne A, Zimmermann DR, y Huder J. Detection of mycobacteria and chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Veterinary pathology*, 2004; 41(4):388-97.
80. Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Imai Y, Sasaki Y, y Tsubaki S. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *Journal of clinical microbiology*, 1996; 34(4): 1034-7.
81. Tan H, Deng Z, y Cao L. Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Letters in applied microbiology*, 2009; 49(2):248-253.
82. Tate RL. Soil Microbiology. 2a ed. The biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants, Academic Press, Estados Unidos, 2000; 47-56 pp.

83. Tokala KC, Strap D, y Jung. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2002; 68:2161–2171.
84. Trujillo M, Kroppenstedt R, Fernández C, Schumann P, y Martínez E. *Micromonospora lupino* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int J Syst Evol Microbiol*. Dec. 2007; 57(12):2799-804.
85. Valdés D, Huss-Danell K y Lavire C. Further characterization of new symbiotic nitrogen fixing non-*Frankia* actinomycetes isolated from nodules of *Alnus acuminata*. Trabajo presentado en la 14ª Reunión Internacional de *Frankia* y plantas actinorrízicas, Universidad de Umea, Umea, Suecia, 2006.
86. Vemireddi V, Sharma A, Wu C, y Lin L. Systemic nocardiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 2007; 19(3):326-9.
87. Vidaver A., Lambrecht P. Bacteria as plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 2004. [acceso 21 de septiembre de 2015] Disponible en: [www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)
88. Watanabe Y, Shinzate N, y Fukatsu T. Isolation of actinomycetes from termites' guts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003; 67: 1797-1801.
89. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 1987; 51(2): 221-271.
90. Wu Y, Lu C, Qian X, Huang Y, y Shen Y. Diversities Within Genotypes, Bioactivity and Biosynthetic Genes of Endophytic Actinomycetes Isolated from Three Pharmaceutical Plants. *Current microbiology*, 2009; 59(4):475-82.