



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Tema: "Análisis filogenético de cepas de *Nocardia brasiliensis*"

PROTOCOLO DEL SERVICIO SOCIAL

Asesor interno: Nora Lidia Sánchez Saucedo

No. Económico: 18752

Asesor interno: Ángel Horacio Sandoval y Trujillo

No. económico: 1156

Nombre del alumno: Ramírez Fernández Mariam Margarita

Matrícula: 2183067452

Lugar de realización del proyecto: Laboratorio de Producción de
Biológicos, edificio N-202 UAM Xochimilco

Abril 2024

ÍNDICE

Introducción	2
Planteamiento del problema y justificación	3
Antecedentes	3
Metodología	6
Cepas de estudio	6
Medio de cultivo	7
Tinción Gram	7
Pruebas bioquímicas	8
Sensibilidad antimicrobiana	8
Extracción de ADN	9
Prueba de pureza amplificando el inserto del gen 23S rRNA y amplificación del gen 16S rRNA e identificación molecular	10
Análisis filogenético y restrictivo	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Procedimiento	12
1. Activación de las cepas de actinobacterias de origen clínico en medios de cultivo adecuados para su crecimiento	12
1.1 Preparación de medio de cultivo Bennet	12
1.2 Siembra en tubo	13
1.3 Siembra en estría cruzada en cajas Petri	13
2. Descripción morfológica colonial y celular y pruebas bioquímicas automatizadas API y sensibilidad a antibióticos	14
2.1 Tinción Gram (ver imagen 10)	14
2.2 Foto Colonial	14
2.3 Pruebas bioquímicas API 20E y 20 NE	14
3. Extracción de ADN de las cepas de estudio y prueba de pureza amplificando el inserto del gen 23S rRNA	17
3.1 Extracción de ADN bacteriano	17
3.2 Amplificación del gen 23S rRNA	18
4. Amplificación del gen 16S rRNA e identificación molecular utilizando herramientas bioinformáticas	19
5. Análisis con enzimas de restricción in situ y análisis filogenético	20
Resultados y discusión	21
Conclusión	26
Cronograma de actividades	26
Referencias	30
Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos	32

Análisis filogenético de cepas de *Nocardia brasiliensis*

Introducción

Actualmente, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen natural, los actinomicetos por su abundante producción de antibióticos naturales y metabolitos secundarios son una fuente potencial de ellos. Los actinomicetos son bacterias filamentosas, Gram positivas, estas se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente como en el suelo, lagos, ríos y océanos. Son microorganismos procariotas, por lo cual no tienen membrana nuclear y su material genético se encuentra en forma libre dentro del citoplasma, tienen un alto contenido de citosina y guanina en su ADN, son heterótrofos, aerobios, poco tolerantes a la acidez (parcialmente ácido resistentes), por lo que crecen de forma óptima en un pH cercano a la neutralidad, (González, 2010; Dávila, 2013 & Cruz, 2021).

Los actinomicetos provocan actinomicetoma, una enfermedad crónica extensiva, que provoca infección granulomatosa, altamente incapacitante y de mal pronóstico, aparece habitualmente en personas de mediana edad que caminan descalzos, especialmente residentes de países tropicales como México y Brasil, de tal modo que, la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en el pie (en el 42% de los casos); los principales agentes causales de esta patología son los géneros *Nocardia*, siendo descritas 119 especies hasta la actualidad, de las cuales una con mayor prevalencia en México es la *Nocardia brasiliensis* representando el agente causal del 65.58% de los casos (2,489 casos) de los 3796 casos totales (con una incidencia de 73 casos por año) que provoca la *Nocardia* (Serrano & Sandoval, s.f, González, 2010 & Hernández, 2010).

El género *Nocardia* pertenece a la familia *Nocardiaceae*, orden de los *Actinomycetales*, clase *Actinobacteria*, phylum *Actinobacteria* y dominio *Eubacteria*, son actinomicetos aerobios Gram positivos, ácido-alcohol resistentes debido a que producen ácido micólico, morfológicamente son filamentosas con tendencia a romperse en cocos y bacilos, se reproducen por fisión binaria y esporas. Viven en el ambiente, en suelo, en agua y en materia orgánica en descomposición. Se ha descrito que su predominio por regiones geográficas de clima tropical húmedo es benéfico para el crecimiento de *N. brasiliensis* (Serrano & Sandoval, s.f).

Nocardia brasiliensis al crecer en los medios de cultivo adecuados, macroscópicamente forman colonias puntiagudas, secas y arrugadas, blanquecinas de su superficie debido a la presencia de micelio aéreo, presentan una coloración desde amarillo claro hasta anaranjado y excepcionalmente ámbar o café. El genoma de *N. brasiliensis* tiene un total de 9, 436, 348 pb, lo que la hace ser una bacteria patógena con un genoma largo comparado con otros patógenos humanos (Mangieri, *et al.* 2021 & Cruz, 2021).

Crece en medios aerobios a de entre 20° C hasta 45°C, especialmente en agar glucosado de Sabouraud, infusión cerebro-corazón (BHI), Lowenstein-Jensen, medio de Bennett, Middlebrook y BCP. Su crecimiento es lento, entre 4 a 6 semanas, aunque forman colonias visibles en 3 a 5 días (Cruz, 2021 & Mangieri, *et al.* 2021).

Los métodos empleados para la identificación de *Nocardia* son las pruebas fenotípicas y posteriormente las pruebas moleculares, siendo éstas últimas más precisas debido a las peculiaridades que posee este género. Además, la realización de un análisis filogenético que nos permitirá estudiar sus relaciones evolutivas entre las secuencias o especies, las cuales descienden de

ancestros comunes, así como también puede indicarnos cuales son las distancias entre ellas (Bioinformatics at COMAV).

Planteamiento del problema y justificación

El actinomicetoma es una infección granulomatosa crónica causada por diversas bacterias filamentosas, siendo *Nocardia brasiliensis* la especie más frecuente, la cual fue descrita inicialmente por Lindenberg en 1909. En 2013 se estimó que la prevalencia de actinomicetoma en México es de 3,796 casos, donde 3,057 (80.53%) son causados por el género *Nocardia*, siendo *N. brasiliensis* el agente causal más común con 2,489 casos (65.58%). Lo cual muestra que *N. brasiliensis* no sólo es la especie de *Nocardia* que se presenta con más frecuencia, sino también el actinomiceto con mayor relevancia clínica (Espinosa, *et al.* 2017 & Padilla *et al.* 2014).

Nocardia brasiliensis causa una enfermedad crónica, que provoca infección granulomatosa, altamente incapacitante y de mal pronóstico, se suele presentar en persona de entre los 16-45 años dedicadas a la agricultura, jardinería y ganadería, que están expuestas a múltiples traumatismos (espinas, astillas de madera, clavos, piedras e instrumentos de labranza) que permiten la inoculación en la piel de los agentes causales (Hernández, *et al.* 2010 & Padilla *et al.* 2014).

Las técnicas moleculares han significado un cambio en la taxonomía de las especies pertenecientes al género *Nocardia*, logrando que actualmente se encuentren identificadas y aceptadas 119 especies. Se ha encontrado que *N. brasiliensis*, posee una alta semejanza con *N. vulneris*, sin embargo, dentro de la misma especie es posible encontrar variaciones importantes y bien definidas que imposibilitan la homogenización de los perfiles bioquímicos, de susceptibilidad a antibióticos e incluso de las secuencias genéticas en este grupo. Por ello se desconoce actualmente si existen subespecies dentro de especie de *N. brasiliensis* o grupos definidos por características topológicas, metabólicas, estructurales o genéticas (Cruz, 2021).

El empleo de métodos moleculares con herramientas informáticas aunado al análisis filogenético, no sólo ayudaría a identificar exitosamente a *N. brasiliensis*, sino también nos permitiría observar, analizar y agrupar las diferencias presentes en las distintas cepas pertenecientes a la misma especie de *N. brasiliensis* explicando su variabilidad que puede deberse a subespecies, lo cual sería algo benéfico para la ampliación de los conocimientos que se tienen hasta el momento sobre esta especie.

Antecedentes

La palabra actinomiceto tiene su origen de los vocablos latinos *aktino* que significa “rayo”, “sol” o algo filamentosos en términos científicos y *mycete* sustantivo que significa “hongo”, haciendo referencia a un hongo con filamentosos, ya que, anteriormente por su apariencia, se pensaba que los actinomicetos eran hongos (Trujillo, 2015).

En cuanto a la clasificación de los actinomicetos, estos pertenecen al dominio Eubacteria, clase Actinobacteria y orden Actinomycetales, los cuales se subdividen en 195 géneros, de los cuales 190 se clasifican en 20 familias y 5 se hallan sin familia asignada (Cruz, 2021).

Los actinomicetos son bacterias filamentosas, Gram positivas, de tamaño pequeño, midiendo menos de 1µm, se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, como en el suelo, lagos, ríos y océanos, son microorganismos con propiedades quitinolíticas, alto porcentaje de guanina (G) y citosina (C) en su ADN, característica que los hace morfológicamente diversos entre

sí y ayuda a diferenciarlos de otras bacterias Gram positivas, poseen ribosomas, no cuentan con aparato de Golgi, retículo endoplásmico ni mitocondrias y su pared celular contiene ácido murámico. Algunas especies de actinomicetos pueden reproducirse también como esporas con gran resistencia a la humedad, a la sequía y al calor (Lloren & Ferreruela, s.f & González, 2010).

La mayoría de las especies son heterótrofas, en su mayoría saprófitos, pueden ser aerobios o anaerobios, según el género, mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25°C y 30°C y son poco tolerantes a la acidez, razón por la cual requieren pH neutro para su óptimo crecimiento, aunque crecen en un rango de pH entre 5 y 9. Metabolizan nitrógeno y carbono y mineralizan la materia orgánica, producen geosmina y metilisoborneol, componentes que le dan el olor característico a “tierra mojada” en exteriores, y en agua de consumo humano pueden causar cambios en su coloración y en su sabor (Cruz, 2021 & González, 2010)

En cuanto su crecimiento, tanto en su medio natural como en medios de cultivo, es muy lento, por lo cual se dificulta su observación, puede variar mucho, en cuanto a la especie o cepa, el tiempo de incubación y el medio de cultivo empleado. De manera experimental, se utilizan medios de cultivo como Sabouraud con actidione, el agar infusión cerebro-corazón (BHI o Hearth-Blood Infusion). En medios sólidos forman colonias puntiagudas, mientras que, en medios líquidos, constituyen formas ramificadas con fragmentación de micelio. Comúnmente se pueden hallar formación de micelio aéreo (*ver imagen 1*) el cual se puede observar sobre las colonias como una estructura blanquecina, difusa y que sobresale del medio de cultivo. Al microscopio, se observan en forma de hifas finas ramificadas, que se fragmentan en cocos y bacilos Gram positivos. El estudio de la morfología de los actinomicetos se basa principalmente en las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo, además en pruebas bioquímicas y moleculares (Serrano & Sandoval, s.f & Uzcátegui-Negrón *et al.* 2003).

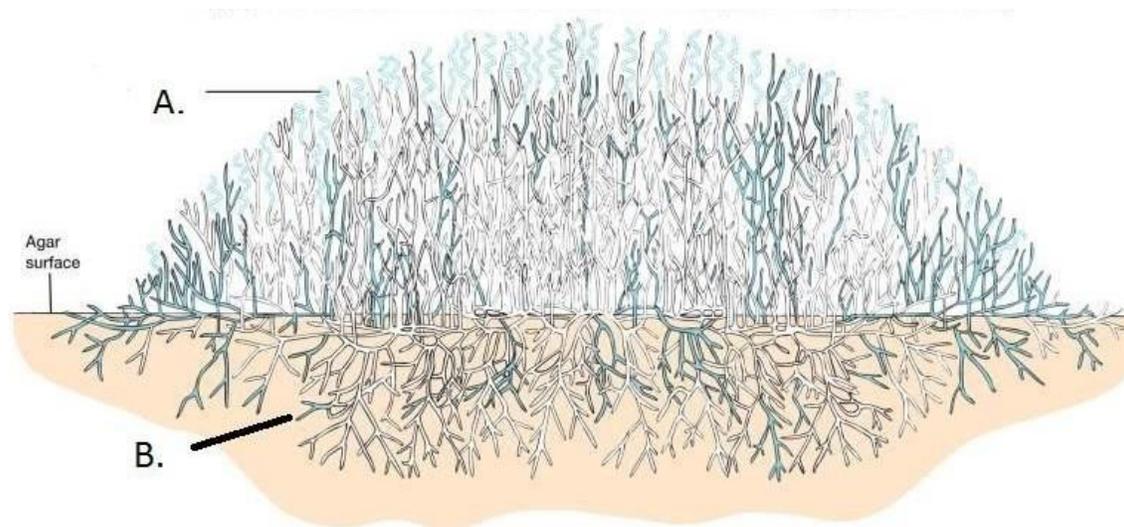


Imagen 1. Morfología de una colonia de actinomiceto en medio sólido. A. Micelio aéreo. B. Micelio-sustrato
Imagen tomada de: Li *et al.*, 2016.

Los actinomicetos causan una enfermedad denominada actinomicetoma que es una infección granulomatosa (*ver imagen 2*) crónica causada por diversas bacterias filamentosas, siendo las especies más frecuentes *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia asteroides*. Esta enfermedad generalmente

aparece en personas de mediana edad que caminan descalzos, radicados en países tropicales, especialmente en México y Brasil. De acuerdo con una actualización de la revisión epidemiológica del micetoma en México, de 3,933 casos, realizada en el año 2013 por López-Martínez y colaboradores, se recopilieron datos de once centros de diagnóstico micológico, de modo que la prevalencia de esta enfermedad fue de 3,796 casos, donde 3,057 (80.53%) son causados por el género *Nocardia*, con una incidencia de 73 casos por año. Siendo *Nocardia brasiliensis* el agente causal más importante, representando el 65.58% de los casos, es decir, en 2,489 casos.



Imagen 2. A) Actinomicetoma provocado por *Nocardia brasiliensis*. B) Grano a nivel microscópico. C) Tinción con lugol. Imágenes tomadas de: Espinosa, *et al.*, 2017.

El término *Nocardia* fue acuñado en 1889 por Vittore Trevisan, es un género que pertenece a la familia *Nocardiaceae*, orden de los *Actinomycetales*, clase *Actinobacteria*, phylum *Actinobacteria* y dominio *Eubacteria*. Según la Lista de Nombres Bacterianos con Nomenclatura Vigente (List of Procariotic Names with Standing in Nomenclature o LPSN), revisada actualmente (2024) existen, aproximadamente 174 especies descritas de *Nocardia*. Este género está caracterizado por ser aerobio, Gram positivo, ácido alcohol-resistente debido a que producen ácido micólico, morfológicamente son filamentosas, con tendencia a romperse en cocos o bacilos, su reproducción se da por fisión binaria y esporas. Su estructura química celular está formada principalmente por peptidoglicanos, quitina, ácidos micólicos y quinona isoprenoide, su pared celular es dependiente de arabinosa y galactosa. Habitan en el ambiente, en suelo, en agua y en materia orgánica en descomposición. Se ha descrito que su predominio por regiones geográficas específicas de *N. brasiliensis* es el clima tropical húmedo (Lloren & Ferreruela, s.f, Hernández, *et al.* 2010 & LPSN).

La especie *Nocardia brasiliensis* fue descrita inicialmente por Lindenberg en 1909, con el nombre de *Discomyces brasiliensis*, sin embargo, a lo largo de los años ha recibido una diversidad de otros nombres como *Streptothrix brasiliensis*, *Oospora brasiliensis*, *Actinomyces brasiliensis* y *Actinomyces violaceus subsp. brasiliensis*, siendo reconocida actualmente con el nombre de *N. brasiliensis* y descrita por Gordon en 1959 (Mangieri, *et al.* 2021).

Macroscópicamente (*ver imagen 3*) esta bacteria forma colonias características de los actinomicetos, puntiagudas, secas y arrugadas, pudiendo evidenciar la presencia del micelio aéreo por las estructuras blanquecinas en la superficie de la colonia, que pueden adquirir una coloración

desde amarillo claro hasta anaranjado y en algunas ocasiones ámbar o café. Microscópicamente son bacterias Gram positivas y ácido-alcohol resistentes, muestran largos filamentos ramificados y forman micelios rizoides o entrelazados. En cuanto al micelio aéreo, este se observa como estructuras cortas, rectas, largas o ramificadas con tendencia a fusionarse (Mangieri, *et al.* 2021).

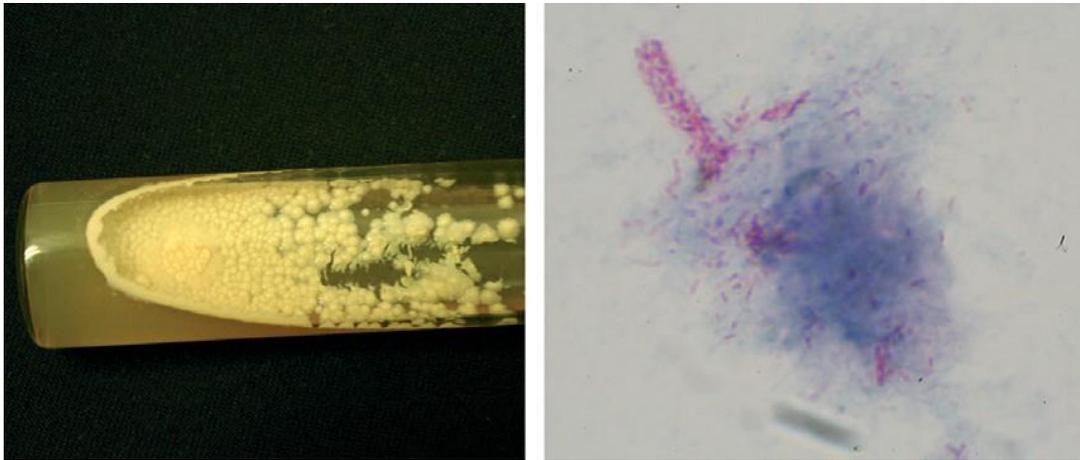


Imagen 3. *Nocardia brasiliensis* a nivel macroscópicamente y microscópicamente. Imagen tomada de: Rodríguez-Gutiérrez, 2014.

El genoma de *N. brasiliensis* tiene un tamaño aproximado de 9.5 Mb, de modo que, muestra ser una bacteria patógena con un genoma largo en comparación con otros patógenos humanos. Se encuentran 8,414 secuencias codificantes de proteínas, 51 para ARNt y 3 para el operón de ARNr 16S-23S-5S. El genoma contiene un 68% de las pares de bases G+C (Cruz, 2021).

N. brasiliensis presenta susceptibilidad a los antibióticos como la amikacina, trimetoprima con sulfametoxazol y resistencia a imipenem, ceftriaxona y pristinamicina (Cruz, 2021).

Metodología

Cepas de estudio

En el presente estudio se sembraron inicialmente 25 cepas de la familia de actinobacterias, de la serie 4000, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Producción de Biológicos de la UAM-Xochimilco, del laboratorio 202 ubicado en el edificio N.

De las cepas sembradas inicialmente, sólo se lograron reactivar 12 que fueron las que se describieron morfológicamente, se les realizaron pruebas bioquímicas, extracción de ADN y amplificación del gen 23S y a 6 de las 12 cepas amplificación del gen 16S e identificación molecular y análisis filogenético.

Medio de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, crean las condiciones necesarias para el desarrollo o crecimiento de los microorganismos. Debido a la gran diversidad metabólica que poseen los microorganismos, existe una amplia variedad de medios de cultivo (Barrero, 2016), entre los que se encuentran los semi-selectivos para el aislamiento de actinomicetos como el **Agar de Bennett** empleado principalmente para el aislamiento de *Nocardia* y *Streptomyces* (Pérez-Corral, *et al.* 2015).

Tinción Gram

Es un tipo de tinción diferencial debido a que emplea dos colorantes (cristal violeta y safranina), por lo cual se diferencian a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias gram positivas (se tiñen de color púrpura o morado) y bacterias gram negativas (se tiñen de color rosa) (*ver imagen 4*), ya que, el principio de esta tinción se basa en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades específicas a cada microorganismo. En la *imagen 4* podemos observar que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa, mientras que a pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa (López-Jácome, *et al.* 2014).

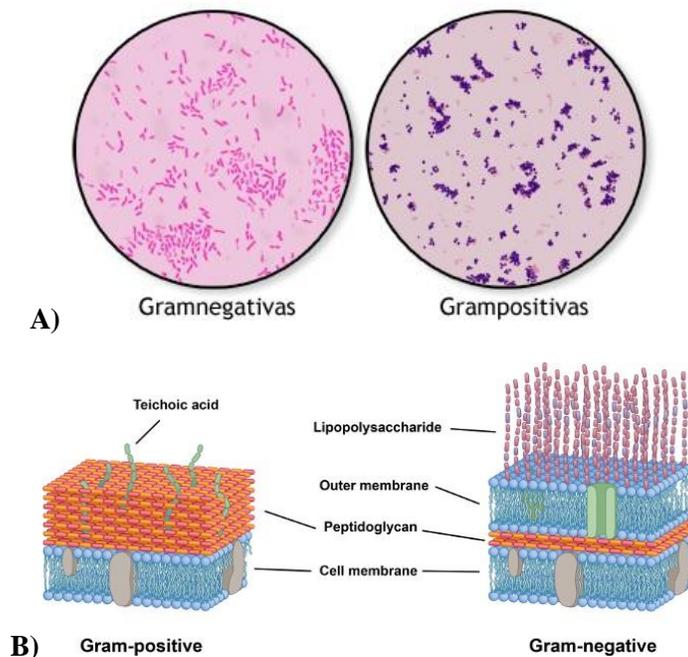


Imagen 4. A) Diferenciación de bacterias Gram positivas y negativas a través de la tinción Gram. B) Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Imagen tomada de: Ikner, s.f.

La tinción de Gram se basa en colocar como colorante primario cristal violeta, el cual posee afinidad con el peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Después se coloca lugol, el cual sirve como mordiente o fijador del color, por lo que impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared celular.

En seguida, se coloca una mezcla de alcohol-acetona que deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de esta y destruye la membrana externa sólo en las bacterias Gram negativas dado que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos, como la mezcla de alcohol-cetona. En cuanto a las bacterias Gram positivas debido a que contienen una gran cantidad de peptidoglicano, retienen con mayor fuerza este complejo, mientras que las Gram negativas no lo pueden retener por tener menos cantidad de peptidoglicano. Finalmente, se coloca safranina, la cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y funciona para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo. Por lo que las bacterias Gram positivas se tiñen de color morado o púrpura, mientras que las Gram negativas son teñidas de color rosa (López-Jácome, *et al.* 2014).

Pruebas bioquímicas:

Pruebas que permiten determinar las características metabólicas de las bacterias que son objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son rápidas o pueden realizarse mediante sistemas miniaturizados como los de API®, los cuales son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos se encuentran en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas dependiendo del tipo de prueba que se requiere montar. Entre las pruebas bioquímicas que se pueden realizar con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, etc.(Apiweb®, 2010).

Existen diferentes sistemas de API® (**ver imagen 5**) que comparten el mismo fundamento, sin embargo, difieren en el número y tipo de pruebas que permiten realizar, ya que su selección está relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar. Y dentro de estos sistemas se encuentran API® 20E y API® 20NE que constan de 20 microtubos que permiten la identificación de la bacteria de estudio (Apiweb®, 2010).

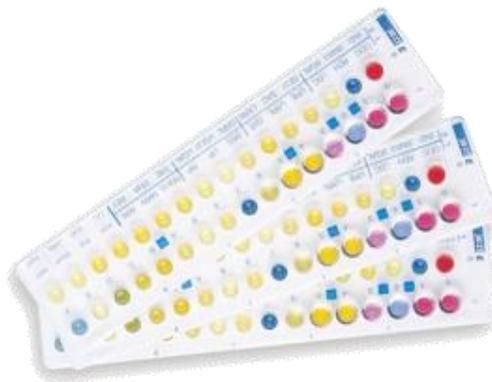


Imagen 5. Sistemas API®. Imagen tomada de: (Apiweb®, 2010).

Sensibilidad antimicrobiana:

Un antibiograma nos permite determinar si un microorganismo, bacteria u hongo no es capaz de crecer en presencia de uno o varios fármacos antimicrobianos. El método del antibiograma disco-placa consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de petri previamente

inoculada con el microorganismo de estudio, discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos. En cuanto el disco impregnado de antibiótico se coloca en la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde a través del espesor del agar radialmente, a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas las 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición si son sensibles al antibiótico y con crecimiento alrededor del disco si no son sensibles como se muestra en la *imagen 6* (Picazo, 2000).



Imagen 6. Halos de inhibición en prueba de sensibilidad antimicrobiana. Imagen propia.

Extracción de ADN:

La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles, lo que depende en gran medida de la forma en que se extrae y purifica al ADN. Hoy en día, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares en los que es posible amplificar genes específicos in vitro a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés : Polymerase Chain Reaction) y secuenciación, los cuales permiten analizar la variación de la molécula del ADN. Estos datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros (Ramos, 2018).

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos largas hebras o cadenas de nucleótidos unidas entre sí que forman una espiral llamada doble hélice. Los nucleótidos están integrados por una azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T)), estas bases se emparejan: A con T y C con G. La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal. Los grupos fosfato están cargados

negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Pero, en presencia de etanol, se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite (**ver imagen 7**). Por otro lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Ramos, 2018).



Imagen 7. Visualización del ADN en tubos eppendorf.

Prueba de pureza amplificando el inserto del gen 23S rRNA y amplificación del gen 16S rRNA e identificación molecular:

En la técnica de PCR cuando se emplean primers universales y específicos permite la amplificación y secuenciación, del gen 16S y 23S rRNA. La amplificación de genes sirve para aumentar el número de copias de un gen. Específicamente la amplificación del gen 23S nos permite asegurar la pureza de las cepas de estudio (Rodicio & Mendoza, 2003).

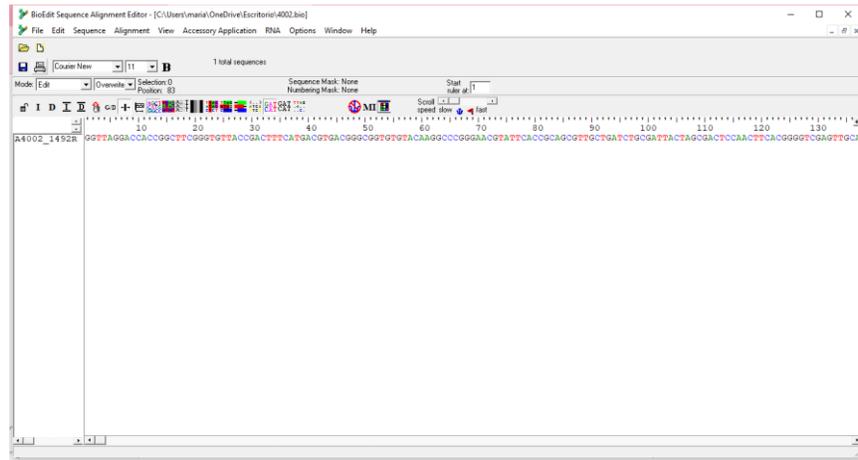
El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Se considera un cronómetro molecular, debido a que cambian con el tiempo, idea introducida por Zuckerkandl y Pauling, que se ha empleado durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (Rodicio & Mendoza, 2003).

El análisis de los 16S rRNA se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procarionta, que tiene un gran impacto en la visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio & Mendoza, 2003).

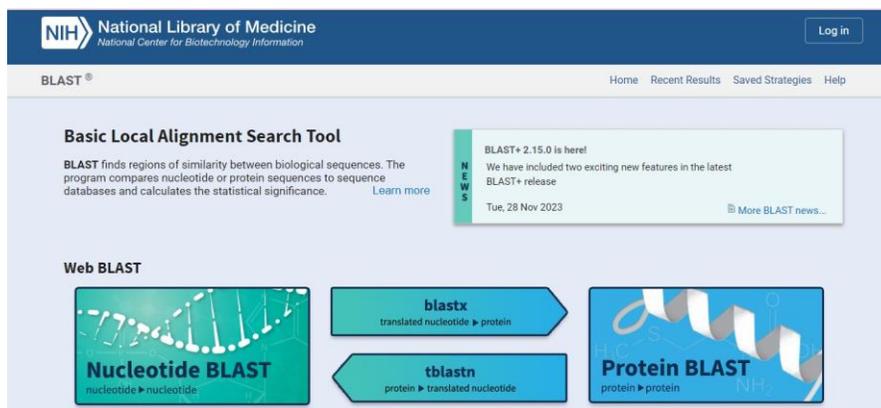
El gen de rRNA 16S tiene una tasa de mutación baja en la evolución, lo que permite la diferenciación entre especies muy relacionadas. Para saber que dos cepas pertenecen a la misma especie, deben presentar una similitud mayor al 98.7% en la secuencia que se obtenga (Cruz, 2021).

Existe una variedad de programas que permiten trabajar con las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S rRNA y saber que tanta similitud tiene dicha secuencia con otras de referencia o tipo. Entre estos programas se encuentran los empleados en el presente trabajo que son:

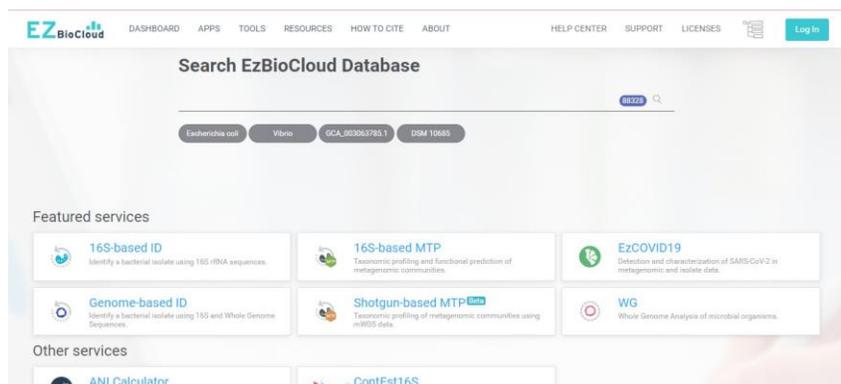
- **BioEdit:** editor que permite la alineación y manipulación de secuencias biológicas de manera sencilla.



- **Blast:** Programa que encuentra regiones similares entre secuencias biológicas de nucleótidos o proteínas y las compara con bases datos de secuencias y calcula la significancia estadística dando un porcentaje (%) de similitud.



- **EzBioCloud:** Permite realizar un análisis del genoma, la identificación de aislados clínicos utilizando datos de las secuencias 16S, es útil para identificar cepas que no pueden caracterizarse mediante métodos convencionales como las pruebas bioquímicas, contiene amplia información del rRNA 16S y secuencias de genomas de cepas “tipo” y muchas cepas de referencia.



Análisis filogenético y restrictivo:

La filogenia la parte de la biología que se encarga del estudio de las relaciones evolutivas cuya finalidad es mostrar la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio e indicar las relaciones evolutivas entre las secuencias o especies, que descienden de ancestros comunes, también puede indicarnos cuales son las distancias entre ellas. El objetivo final es un árbol filogenético también conocido como dendrograma, en el que se refleja el proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de descendencia con modificación entre especies ancestrales y descendientes (Peña, 2011).

Por otro lado, un análisis restrictivo se lleva a cabo gracias a las enzimas de restricción, las cuales son una herramienta importante para diversos métodos de laboratorio como la PCR, la modificación genética, clonación de secuencias de ADN, la tecnología de ADN recombinante, entre muchas otras áreas de la genómica. Son proteínas aisladas a partir de bacterias que reconocen los pares de bases en el ADN, se unen a una secuencia palindrómica que tiene una copia espejo de sí misma y permiten cortar las secuencias de ADN en sitios específicos, dando fragmentos de ADN con una secuencia conocida (NIH, s.f & González & Bueno, 2013).

Objetivo general:

Realizar un análisis filogenético de cepas de *Nocardia brasiliensis* de la colección de cepas del Laboratorio de Producción de Biológicos

Objetivos específicos:

- Realizar un análisis taxonómico de las cepas de estudio.
- Realizarles un antibiograma a las cepas de *Nocardia brasiliensis*.
- Extraer el ADN y realizar PCR a las cepas de estudio.
- Realizar un análisis filogenético y restrictivo de las cepas de *Nocardia brasiliensis*.
- Aplicar las técnicas de restricción *in silicio* para un análisis filogenético.

Procedimiento

1. Activación de las cepas de actinobacterias de origen clínico en medios de cultivo adecuados para su crecimiento.

1.1 Preparación de medio de cultivo Bennet

- a) En un litro de agua se disolvieron los siguientes componentes:
 - Extracto de levadura ----- 1 g
 - Extracto de carne----- 1 g
 - Caseína digerida----- 2 g
 - Glucosa ----- 10 g
- b) Se esterilizó en autoclave a 1 atm durante 15 min.

1.2 Siembra en tubo

- Se colocó aproximadamente 5 ml del medio de cultivo previamente preparado en los tubos.
- Se esterilizaron a 1 atm durante 15 min.
- Se inclinó el tubo y dejaron enfriar.
- Se procedió a sembrar en un área limpia y estéril, se esterilizó el asa bacteriológica, se enfrió y tomó la cepa, se sembraron en forma de zig-zag como se muestra en la *imagen 8*.

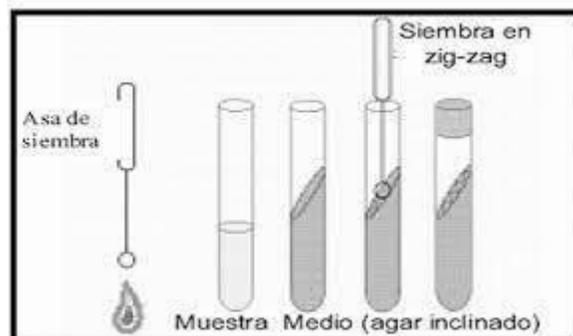


Imagen 8. Siembra en tubo en zig-zag. Imagen tomada de: Castillo, *et al.* s.f.

1.3 Siembra en estría cruzada en cajas Petri

Se llenaron las cajas Petri a $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con el medio de cultivo previamente esterilizado y se dejó enfriar.

- Luego se procedió a esterilizar el asa bacteriológica.
- Se tomó la muestra de la cepa a sembrar.
- Se sembraron en forma de estría cruzada como se muestra en la *imagen 9*.

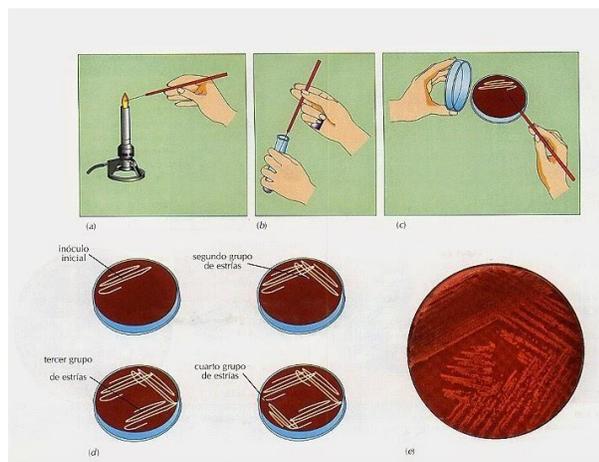


Imagen 9. Siembra por estría cruzada. Imagen tomada de: Reyes, 2014.

2. Descripción morfológica colonial y celular y pruebas bioquímicas automatizadas API y sensibilidad a antibióticos.

2.1 Tinción Gram (ver imagen 10)

- Se colocó una colonia en un portaobjetos limpio con un poco de agua destilada para que la muestra se pueda esparcir bien y fijarlo al fuego con los mecheros.
- Se puso el portaobjetos en el puente de tinción y colocarle el colorante primario cristal violeta durante 1 min y quitar el exceso con agua.
- Luego se le agregó Lugol de igual manera durante 1 minuto y se enjuagó con agua.
- Se decoloró con alcohol-acetona y enjuagó con agua.
- Finalmente se agregó el colorante secundario safranina durante un minuto y quitó el exceso con agua.
- Se dejó secar, se le agregó una gota de aceite de inmersión, se observó al microscopio con el objetivo 100x y se determinó si la bacteria es Gram positiva o negativa y que tipo de bacteria es.

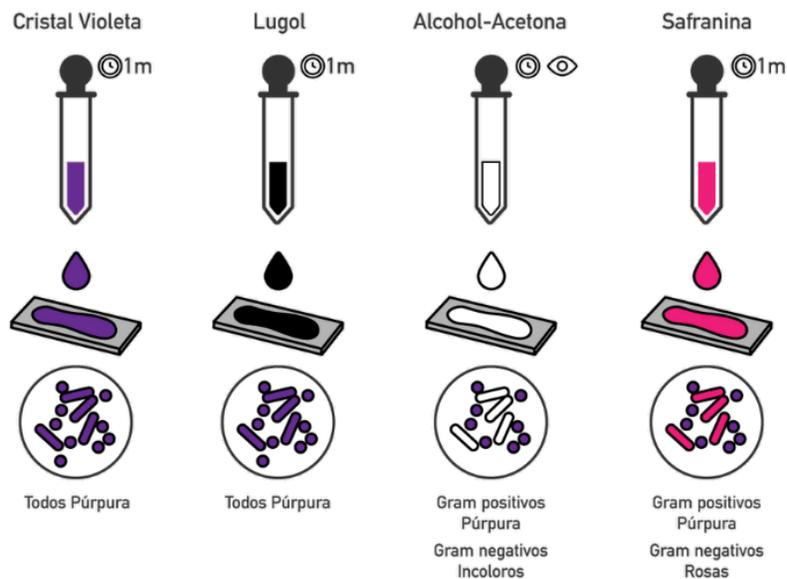


Imagen 10. Pasos para llevar a cabo la Tinción Gram. Imagen tomada de CIH.

2.2 Foto Colonial

- Se sembró en forma de botón la cepa de estudio en un área limpia y estéril.
- Se incubó en la estufa a 37° C hasta presentar crecimiento.
- Se tomó la foto colonial con ayuda de una cámara fotográfica y se realizó el análisis y descripción morfológica.

2.3 Pruebas bioquímicas API 20E y 20 NE

2.3.1 Se preparó solución salina fisiológica al 0.9% para esterilizarlas en tubos de ensayo con perlas de vidrio.

2.3.2 Posteriormente se depositó la biomasa en ellos y se sometió a vortex.

API 20 E

- Se llenó de agua los alvéolos para crear un ambiente húmedo para la suspensión bacteriana en los tubos de la galería, evitando formar burbujas.
- Para las pruebas CIT, VP y GEL se llenó y para las demás pruebas se llenó solo el tubo.
- Para ADH, LDC, ODC, H₂S y URE se llenó la cúpula con aceite de parafina (glicerina) para crear un ambiente anaerobio.
- Se cerró la cámara e incubó por 48 h a 37° C
- Se realizó la lectura e interpretó:
 - 1 gota de reactivo TDA a la prueba TDA. Marrón indicó **POSITIVO (+)**
 - 1 gota de reactivo JAMES a la prueba IND. Rosa indicó **POSITIVO (+)**
 - 1 gota de reactivo VP1 y VP2 a la prueba VP y se esperó que transcurrieran 5 min. Rosa-rojo indicó **POSITIVO (+)**. Si apareció 10 min después era **NEGATIVO (-)**.
- Reducción de NO₂ y N₂ y formación de Nitrógeno. Se agregó una gota de NIT 1 y NIT 2 a la prueba GLU y se espero que pasaran 5 min. Rojo indicó **POSITIVO (+ NO₂)**. Amarillo o microburbujas indicó **NEGATIVO (- N₂)**. Se agregaron de 2 a 3 mg de Zinc en la prueba GLU y se esperó que transcurrieran 5 min. Amarillo indicó **POSITIVO (+ N₂)**, Rojo-naranja indicó (NO₂)
- En la *imagen 11* se muestra cómo se visualizan los resultados negativos y positivos de la prueba bioquímica API 20E.

P O S I T I V O	A	R	R	R	A	N	R	M	R	R	N	A	A	A	A	A	A	A	A
	M	O	O	O	Z	E	O	A	R	O	O	M	M	M	M	M	M	M	M
	A	J	J	J	U	G	J	R	S	S	I	A	A	A	A	A	A	A	A
	R	O	O	O	L	R	O	R	A	A	R	A	A	A	A	A	A	A	A
	I	-	-	-	V	O	-	-	-	-	-	O	O	O	O	O	O	O	O
	L	N	N	N	E		N	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	L	A	A	A	R		A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	I	A	A	A	D		A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	V	N	N	N	E		A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	O	J	J	J			A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R



Imagen 11. Resultados negativos y positivos de la prueba bioquímica API 20E. Imagen tomada de (Apiweb®, 2010).

API 20 NE: Sistemas de 8 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación.

- Agregar agua en alveolos para crear un ambiente húmedo.
- Rellenar los tubos de NO₃ a PNPG con suspensión bacteriana salina.
- Abrir la ampolla APIAUX Medium y transferir 200 µl de la suspensión salina bacteriana y homogeneizar.
- Rellenar los tubos y cúpulas desde GLU a PAC.
- Rellenar con aceite de parafina los ensayos GLU, ADH y URE.
- Cerrar la cámara e incubar por 48 hrs. A 37°C.
- Realizar la lectura e interpretar:
 - 1 gota reactivo NIT 1 y NIT
 - Sensibilidad antimicrobiana a NO₃. Después de 5 min color rojo indica POSITIVO (+). Si es NEGATIVO (-) agregar Zn, incoloro indica POSITIVO y rosa-rojo indica NEGATIVO (-) (los nitratos se han reducido a nitritos por la adición de Zn).
 - 1 gota de JAMES a TRP. Rosa indica POSITIVO (+).
 - Cúpula turbia indica POSITIVO (+) en ensayos de asimilación.

h) En la *imagen 12* se muestra cómo se visualizan los resultados negativos y positivos de la prueba bioquímica API 20NE.

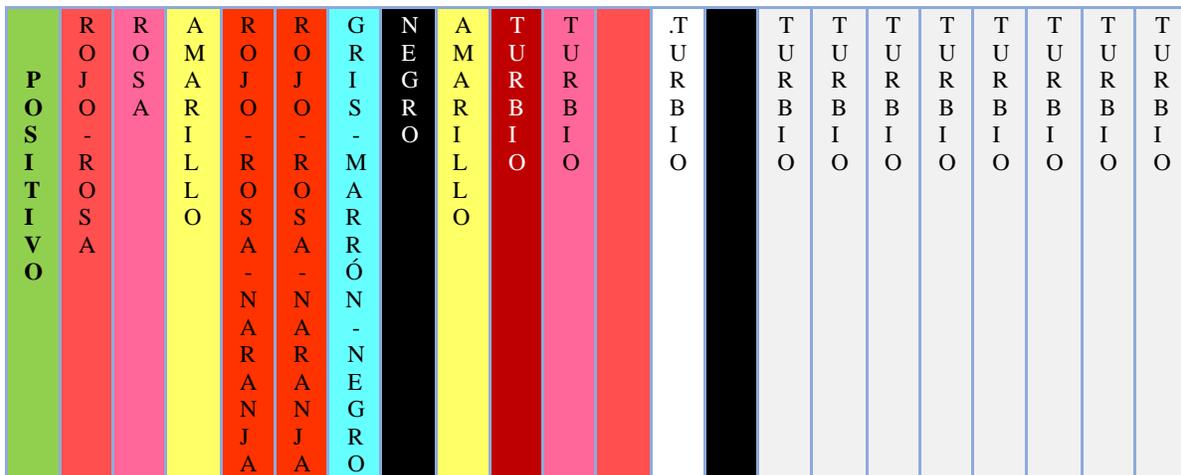


Imagen 12. Resultados negativos y positivos de la prueba bioquímica API 20NE. Imagen tomada de (Apiweb®, 2010).

2.4 Sensibilidad antimicrobiana:

3. Se sembraron las cepas de estudio en medio de cultivo Bennet por siembra masiva (*ver Imagen 13*).

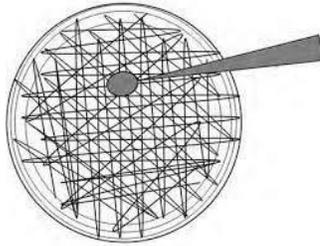


Imagen 13. Visualización de siembra masiva bacteriana en caja.

4. Se colocaron los siguientes diferentes sensidiscos de antibióticos comerciales impregnados, sobre la cepa sembrada previamente:

- Rifampicina 5 µg (RF)
- Amikacina 30 µg (AN30)
- Cefamandol 30 µg (MA30)
- Ciprofloxacino 5 µg 5 µg (Cip5)
- Eritromicina 15 µg (E 15)
- Bacitracina 10 IU/IER_/UI (B10)
- Cefotaxima 30 µg (CTX 30)
- Ceftizidima 30 µg (CAZ30)
- Carbenicilina 100 µg (CB100)
- Amoxicilina/Ácido Clavulonico 30 µg (AMC30)
- Vancomicina 30 µg (VA30)
- Estreptomina 10 µg (S10)
- Piperacilina 100 µg (PIP100)
- Ampicilina 10 µg (AM10)
- Rifampicina 5µg (RA5)

5. Se incubaron en la estufa a 37°C hasta notar crecimiento (aproximadamente 4 días) y se observó si hubo formación de halos de inhibición alrededor del sensidisco impregnado con el antibiótico (*ver imagen 6*) para reportar si hubo sensibilidad o no.

6. **Extracción de ADN de las cepas de estudio y prueba de pureza amplificando el inserto del gen 23S rRNA.**

6.1 Extracción de ADN bacteriano:

- a) Se resuspendieron las células con 480µL de EDTA 0.5 M
- b) Se les adicionó 60µL de lisozima y mezcló cuidadosamente.
- c) Se incubaron las muestras a 37°C por 1 hora, en la estufa.
- d) Se centrifugaron a 14000rpm por 5 min. y se removió el sobrenadante.
- e) Se agregó 600µL de solución de lisis nuclear del paquete de purificación Promega y

mezcló cuidadosamente.

- f) Se incubaron las muestras a 80°C por 5 min. en baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- g) Se les añadió 3µL de solución de RNAsa y mezcló por inversión del tubo 3 veces.
- h) Se incubaron a 37°C por una hora en la estufa y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- i) Se les añadió 200µL de solución de precipitación de proteínas y se agitó en vortex por 20 segundos.
- j) Se incubaron en hielo por 5 min.
- k) Se centrifugaron a 14000 rpm por 3 min. y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 600µL de isopropanol.
- l) Se mezclaron suavemente hasta la formación de hebras de ADN.
- m) Nuevamente se centrifugaron a 14000 rpm por 2 min. y se drenó el tubo en papel absorbente.
- n) Se les adicionó 600 µL de etanol al 70% y se invirtieron los tubos varias veces para no despegar el pellet.
- o) Se centrifugaron a 14000 por 2 min y se eliminó cuidadosamente el etanol. Se dejaron secar por 10-15 min.
- p) Se les agregó 100µL de solución rehidratante y se incubaron en refrigeración por 24 horas (4° C).
- q) Finalmente se visualizó el ADN bacteriano mediante electroforesis en gel de agarosa.

6.2 Amplificación del gen 23S rRNA:

La amplificación del gen 23S mediante PCR, es un biomarcador que sirve para la identificación del grupo actinobacteria y es visualizada en una electroforesis.

En esta técnica se emplearon dos primers o cebadores:

→ InsF 5'-MAD GCG TAG NCG AEG G-3'

→ InsR 5'-GTG WCG GTT NBG GTA-3'

- a) Se esterilizó todo el material a utilizar y se realizó todo el proceso en la campana de extracción.
- b) En un tubo eppendorf se fue agregando el siguiente mix:
23S Taq Green Mix 9 reacciones
 - ADN 1.0 µl
 - Búfer
 - Primer F 2.5 µl
 - Primer R 2.5 µl
 - Taq 12.5 µl (Go Taq® G2 Green Master Mix)
 - H₂O 2.5 µl (agua libre de nucleasas)
- c) La PCR se llevó a cabo en ciclos en los que sucede la pre-desnaturalización, desnaturalización, acoplamiento y elongación, bajo las siguientes condiciones:
 - 94 °C por 5 min (pre-desnaturalización)
 - 94°C por 1 min (desnaturalización)
 - 59°C por 30 seg (acoplamiento)

} 40 ciclos

- 72 °C por 10 min (elongación)
 - 4° C ∞
- } 40 ciclos

d) Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1.5%, el cual se elaboró como en la tabla de a continuación. Siendo la amplificación de una banda de 350 pb la de una actinobacteria.

Visualización de amplificación de 23S	
	<i>Molde grande</i>
TAE 1X	30 mL
Agarosa	450 mg a 1.5%
Bromuro de etidio	3 µL
Búfer de carga	2 µL
ADN	15 µL
Marcador de peso molecular de 100pb	5 µL
Tiempo de cámara	25 min

Tabla 1. Componentes para la realización del molde grande de gel de agarosa para la visualización de amplificación del gen 23S.

7. Amplificación del gen 16S rRNA e identificación molecular utilizando herramientas bioinformáticas.

a) En esta técnica se emplearon dos primers o cebadores:

→ 1492R 5'-TAC GGY TACCTTGTTACGACT T-3'

→ InsR 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

- ADN 3.0 µl
- Búfer 2.5 µl
- Primer F 2.5 µl
- Primer R 2.5 µl
- Taq 0.2 µl
- H2O 14.3 µl

25 µl

b) La amplificación del gen 16S se llevó a cabo en los siguientes ciclos:

- 94 °C por 5 min (pre-desnaturalización)
 - 94°C por 1 min (desnaturalización)
 - 59°C por 30 seg (acoplamiento)
 - 72 °C por 10 min (elongación)
 - 4° C ∞
- } 40 ciclos

- c) Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1.5%, elaborado como se muestra en la tabla de a continuación. Siendo la amplificación de una banda de 1400-1500 pb la de una actinobacteria.

Visualización de amplificación de 16S	
	<i>Molde grande</i>
TAE 1X	30 mL
Agarosa	450 mg a 1.5%
Bromuro de etidio	3 µL
Búfer de carga	2 µL
ADN	10 µL
Marcador de peso molecular de 100pb	5 µL
Tiempo de cámara	25 min

Tabla 2. Componentes para la realización del molde grande de gel de agarosa para la visualización de amplificación del gen 16S.

8. Análisis con enzimas de restricción in situ y análisis filogenético

- Se mandaron a secuenciar el ADN de las 7 cepas de estudio, en el cual se emplearon enzimas de restricción que cortaron las secuencias de ADN en sitios específicos.
- Nos enviaron las secuencias a las cuales posteriormente con ayuda del programa BioEdit (*ver imagen 14*) se pudieron editar, alinear la secuencias R y F y finalmente se obtuvo una secuencia contig.

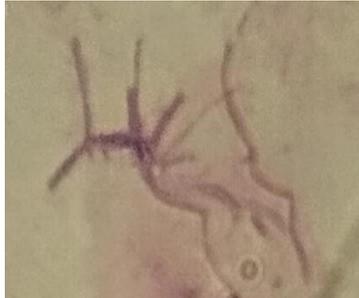
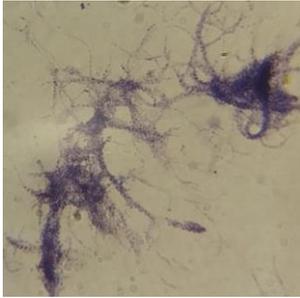


Imagen 14. Carátula programa BioEdit

- c) Posteriormente la secuencia contig obtenida previamente se copió y pegó en las bases de datos Blast y EzBioCloud en donde se encontraron regiones similares entre secuencias biológicas 16S y se compararon con bases datos de secuencias y se calculó la significancia estadística dando porcentajes (%) de similitud que se observan en la *tabla 8*.

Resultados y discusión

En cuanto a sus características microscópicas se observó que todas las cepas de estudio son gram positivas (gram +), filamentosas, hifas ramificadas y fragmentadas, como se observa en la *tabla 3*.

		
4002	4016	4118
		
4224	4232	4235
		
4239-B	4316	4407-B

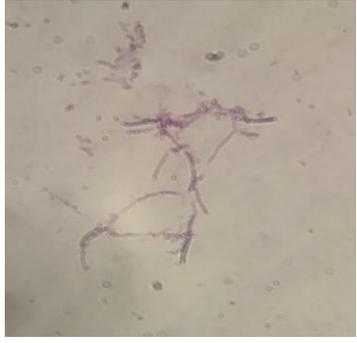
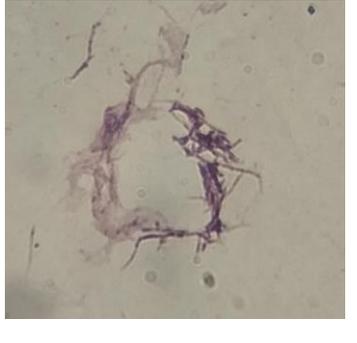
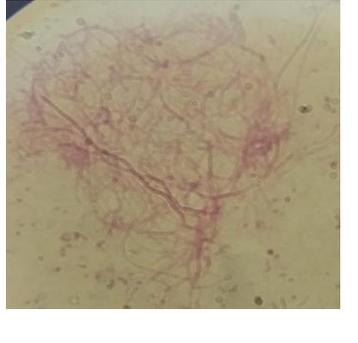
		
4416	4428	4464

Tabla 3. Imágenes microscópicas de las cepas de estudio.

De manera macroscópica se observaron variabilidades en la morfología de las cepas de estudio, en cuanto al color (blanquecinas de su superficie debido a la presencia de micelio aéreo, de color amarillo claro, anaranjadas, ambar) tamaño y formación de colonias. Sin embargo, tienen en común la dureza, forma puntiaguda, colonias secas y arrugadas, como se observa en la *tabla 4*.

		
4002	4016	4118
		
4224	4232	4235

		
4239-B	4316	4407-B
		
4416	4428	4464

Tabla 4. Visión macroscópica de la morfología de las cepas de estudio (fotos coloniales).

Las pruebas bioquímicas permitieron determinar las características metabólicas y necesidades nutricionales de las bacterias objeto de identificación. Obteniendo los resultados que se muestran en la **tabla 5 y 6**.

Por otra parte, con respecto a las pruebas de sensibilidad antimicrobiana podemos observar en la **tabla 7** que hay diferencias entre las cepas en cuanto al antibiótico a las cuales son resistentes y sensibles, aunque se trate del mismo género de bacterias, sin embargo, todas las cepas mostraron una similitud en cuanto al antibiótico que son resistentes, que es la Rifampicina pese a que es un agente bactericida de amplio espectro y es activa contra bacterias gram positivas y contra algunas micobacterias (Rodríguez, 2015).

La extracción de ADN permitió la separación y purificación del ADN de las cepas de estudio cuya finalidad fue poder analizarlo y manipularlo para poder llevar a cabo la amplificación del gen 23S (**ver imagen 15**) que permitió descartar a aquellas cepas de estudio que no mostraron una banda de amplificación de 350 pb que indicaba que era una actinobacteria, lo que pudo indicar que las cepas no estaban puras, posiblemente porque estaban contaminadas por otras bacterias. Las cepas descartadas fueron las de la serie 4232, 4235, 4239-B, 4407-B y 4428, cepas que no se mandaron a secuenciar y no se les realizó el análisis filogenético por lo anterior mencionado.

Así mismo la extracción de ADN permitió la amplificación del gen 16S que favoreció en la confirmación de que las cepas de estudio realmente fueran actinobacterias, esto se confirmó con la

banda de amplificación del rango de 1400-1500 pb. Las cepas que obtuvieron estos valores, fueron las enviadas para ser secuenciadas y así poderles realizar el análisis filogenético con ayuda de las bases de datos EzBioCloud y BLAST, que nos proporcionaron datos del % de identidad que muestran en la **tabla 8**, de tal modo que se realiza un análisis del genoma y se compara con la información de estas bases de datos y así se obtuvo el nombre de la bacteria con la cual tiene similitud la secuencia de estudio.

Clave de la cepa	% De identidad Blast	% De identidad ezBioCloud
4002	80.77 % <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>strain ZC-21</i> 80.77% <i>Nocardia altamirensis strain DSM</i> 44997	84.60% <i>Nocardia altamirensis</i>
4002 F	94.17% <i>Nocardia brasiliensis strain 2</i>	78.75% <i>Nocardia vulneris</i> NBRC 108936
4002 R	99.78% <i>Nocardia brasiliensis LAZC-25</i> 99.78% <i>Nocardia vulneris</i> NBRC W9851	99.89% <i>Nocardia vulneris</i> NBRC 108936
4016	76.47% <i>Nocardia brasiliensis strain yhl1</i>	96% <i>Nocardia altamirensis</i>
4016 F	96.58% <i>Nocardia basiliensis strain yhl1</i>	75% <i>Nocardia brasiliensis</i>
4016 R	98.22% <i>Nocardia brasiliensis strain ZC-1</i>	96.81% <i>Nocardia altamirensis</i>
4118	98.84% <i>Nocardia brasiliensis strain</i> AZC-19	98.91% <i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402
4118 F	97.17% <i>Nocardia brasiliensis strain</i> 4022-LPB	96.94% <i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402
4118 R	99.68% <i>Nocardia brasiliensis strain XH01</i>	99.89% <i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402
4224	94.51% <i>Nocardia brasiliensis strain</i> AZC-19	94.9% <i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402

4224 F	97.56% <i>Nocardia brasiliensis</i> strain 4056	86.65% <i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402
4224 R	95.17% <i>Nocardia brasiliensis</i> strain	95.68% <i>Nocardia brasiliensis</i> NBRC 14402
4416	99.12% <i>Nocardia mikamii</i> strain W9013 16S ribosomal RNA gene.	98.30% <i>Nocardia cerradoensis</i>
4416 F	100% <i>Nocardia mikamii</i> strain W9013 16S ribosomal RNA gene.	100% <i>Nocardia mikamii</i>
4416 R	100% <i>Nocardia mikamii</i> strain W9013 16S ribosomal RNA gene.	100% <i>Nocardia mikamii</i>
4464	97.11% <i>Nocardia exalbida</i> strain DSM 44883 16S ribosomal RNA.	97.7% <i>Nocardia exalbida</i>
4464 F	99.72% <i>Nocardia exalbida</i> strain DSM 44883 16S ribosomal RNA.	99.72% <i>Nocardia exalbida</i>
4464 R	100% <i>Nocardia exalbida</i> strain DSM 44883 16S ribosomal RNA.	100% <i>Nocardia exalbida</i>

Tabla 8. Porcentajes (%) de Identidad según EzBioCloud y BLAST de las diferentes cepas de estudio.

Como se puede observar en la **tabla 8** al menos 5 de las 7 cepas que se mandaron secuenciar, la primera opción arrojada por las bases de datos, presentaron un porcentaje de similitud mayor con el género *Nocardia brasiliensis* como se esperaba.



Imagen 15. Electroforesis de la amplificación del gen 23S de las cepas de estudio.

Conclusión

La morfología microscópica y macroscópica, así como las pruebas bioquímicas tales como sensibilidad a antibióticos y API nos ayudaron a conocer a las bacterias de estudio, identificando sus características fenotípicas

La amplificación de diferentes genes, nos ayudaron a conocer a las bacterias de estudio a nivel taxonómico. La amplificación del inserto del gen 23S rRNA nos permitió comprobar que nuestras cepas son de la familia de actinobacterias al amplificar el inserto de gen a 350pb. La amplificación del gen 16S rRNA nos permitió identificar a las cepas a nivel de género y especie.

Las pruebas fenotípicas y genéticas nos indicaron características diferentes en las cepas de la misma especie, *Nocardia brasiliensis*, lo que nos demuestra que esta especie tiene diferencias fenotípicas interespecie y se sugiere que puede ser un complejo.

Este trabajo demuestra diferencias entre las especies del filo *Nocardia brasiliensis*.

Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR
1.Activación y siembra de cepas	X	X					
2.Descripción morfológica y pruebas bioquímicas		X	X				
3.Extracción de ADN y amplificación del gen 23S rRNA				X			
4.Amplificación del gen 16S rRNA e identificación molecular					X		
5.Análisis filogenético						X	
6.Escritura del reporte final							X

Tabla 9. Cronograma de actividades a realizar en la presente investigación.

API 20 E

PRUEBAS																						
CEPAS	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂	N ₂
4002	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4016	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4118	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4224	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4232	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4235	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4239-B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4316	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4407-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4416	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
4428	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4464	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tabla 5. Pruebas bioquímicas API 20E.

API 20 NE																				
	PRUEBAS																			
CEPAS	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
4002	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
4016	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
4118	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
4224	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
4232	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
4235*	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
4239-B	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
4316	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
4407-B	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
4416	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
4428	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
4464	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Tabla 6. Pruebas bioquímicas API 20NE.

Cepa	ANTIBIÓTICOS														
	RF	AN30	MA30	CIP5	E15	B10	CTX30	CAZ30	CB100	AMC30	VA30	S10	PIP100	AM10	RA5
4002	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4016	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
4118	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
4224	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
4232	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R
4235	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
4239-B	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R
4316	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
4407-B	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
4416	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
4428	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
4464	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R

Tabla 7. Resultados de la Sensibilidad Antimicrobiana, donde R=Resistente y S=Sensible.

Referencias

1. Apiweb® . (2010). SISTEMAS MINIATURIZADOS API®. [CD-ROM] BioMérieux.
2. Barrero, L. (2016). Microbiología Clínica. Editorial Síntesis S.A. p. 39.
3. Bioinformatics at COMAV.s.f. Filogenias. Bioinformatics at COMAV is licensed under a Creative Commons. Disponible en: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/filogenias.html
4. Capacitación y Consultoría Integral en Salud (CIH). Tinción de Gram cihmexico/photos/a.103556577734849/729990798424754/?type=3&locale=ms_MY
5. Castillo, J., Gurrola, A., Herrera, M. e Islas, Y. s.f. Introducción al Análisis Bacteriológico Manual de Prácticas. Escuela Nacional Preparatoria, UNAM. Disponible en: <http://www.ete.enp.unam.mx/IntroAnaBacter>
6. Cruz, M. (2021). Estudio de variaciones genéticas de cepas de *Nocardia brasiliensis*, basado en técnicas de restricción enzimática. Universidad Autónoma del Estado de México Facultad de Medicina Coordinación de Estudios de Posgrado.
7. Dávila, M., Gallegos, D., Hernández, F., Ochoa, Y. & Flores, A.(2013). Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatogenos de importancia agrícola. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 8 (4) p. 1188
8. Espinosa, S., Perales, D., Ponce, RM., Buitrón-García, R., & Bonifaz, A. (2017). Actinomicetoma en el embarazo. Reporte de un caso: ¿Qué hacer y cómo tratarlo?. Ginecol Obstet Mex. 85 (3) p. 193. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/gom/v85n3/0300-9041-gom-85-03-00190>
9. González, J. & Bueno, M. (2013). Enzimas de restricción. Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw-Hill Education. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743841>
10. González, Y. (2010). Los actinomicetos: una visión como promotores de crecimiento vegetal. Pontificia universidad javeriana facultad de ciencias carrera de microbiología agrícola y veterinaria.
11. Hernández, P., Mayorga, J. & Pérez, M. (2010). Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Elsevier Doyma. An Pediatr (Barc). 73(4) p. 213.
12. Ikner, L. s.f. Tinción de Gram de la Bacteria de fuentes ambientales. Laboratorios del Dr. Ian Pepper y el Dr. Charles Gerba - Universidad de Arizona. Jove. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19955.htm y <https://www.jove.com/es/v/10092/gram-staining-of-bacteria-from-environmental-sources?language=Spanish>
13. Li *et al.* 2016. Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su potencial actividad antagonista frente a *Vibrio* sp. AISLADOS DE *Litopenaeus vannamei* - Scientific Figure on ResearchGate. Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Morfologa-comn-de-una-colonia-de-actinomiceto-en-medio-slido-A-Micelio_fig3_327339360
14. López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Laboratorio de Infectología, Centro Nacional de Investigación y

- Atención a Quemados (CENIAQ), Instituto Nacional de Rehabilitación. Investigación en discapacidad 3 (1) p. 12 y 13.
15. Llorenc, B. & Ferreruela, V. s.f. *Nocardia asteroides*. Control de Calidad SEIMC. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/nocardia>
 16. LPSN. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Recuperado de: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=nocardia>
 17. Mangieri, N., Nuñez, D., Echavarrí, G., Bertona, E., Castello, L. Benchetri, G., De Paulis, A. (2021). *Nocardiosis esporotricoides* por *Nocardia brasiliensis*. ELSEVIER. **53** (1) p. 43-47.
 18. National Human Genome Research Institute (NIH). (2013). Enzima de Restricción. Department of Health & Human Services. USA. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Enzima-de-restriccion#:~:text=Una%20enzima%20de%20restricci%C3%B3n%20es,secuencia%20conocida%20en%20cada%20extremo>.
 19. Padilla, M., Caballero, A. & Martínez E. (2014). Micetoma por *Nocardia brasiliensis* en región abdominal. Rev Cent Dermatol Pascua **23** (1) p. 17. Disponible en <http://www.medigraphic.com/dermatologicopascua>
 20. Pérez-Corral, D., García-González, N., Gallegos-Morales, G., Ruiz-Cisneros, M., Berlanga-Reyes, D. & Ríos-Velasco, C. (2015). Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonísticos a *Fusarium equiseti*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas **6** (7) p. 1632.
 21. Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica (Métodos básicos para el estudio de sensibilidad antimicrobiana). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. p. 4. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11>.
 22. Ramos, S. (2018). Extracción Y Purificación De ADN; Introducción e Importancia De La Extracción Del ADN. Analitek. Disponible en: <https://blog.analitek.com/extraccion-y-purificacion-de-adn-introduccion-e-importancia-de-la-extraccion-del-adn-0-0-1#:~:text=La%20extracci%C3%B3n%20consiste%20en%20el,s%C3%AD%20formando%20una%20doble%20h%C3%A9lice>.
 23. Reyes, L. (2014). Técnicas y Métodos de estriado en caja y tubo (medios de cultivo). Tecnología de Blogger. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>
 24. Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. ELSEVIER. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-lo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>
 25. Rodríguez-Gutiérrez, G., Toussaint, S., Hernández-Castro, R., Del Carmen Sánchez-León, M. & Arenas, R. (2014). *Nocardia brasiliensis* infection: an emergent suppurative granuloma after mesotherapy. Int J Dermatol. **53**(7). p. 888.

26. Rodríguez, R. (2015). Rifampicina: antituberculosos Vademécum Académico de Medicamentos. McGraw-Hill Education. Recuperado de: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90374752>
27. Trujillo, B. (2015). Propiedades generales de los actinomicetos. *Micología médica básica*, 5e. McGraw-Hill Education. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1529§ionid=98865575>
28. Uzcátegui-Negrón, M., Serrano, JA., Díaz-Corrales, F & Avella J. (2003). Selective isolation of *nocardia brasiliensis* from soil samples from san juan de lagunillas, mérida state, venezuela, using a tetracycline medium. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 23 (1). pp. 1315-1321 Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100009

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos

QFB. Nora Lidia Sánchez Saucedo

Nombre y firma del asesor interno
Laboratorio de Producción de Biológicos.
Número económico: 18752

Dr. Ángel Horacio Sandoval y Trujillo

Nombre y firma del asesor interno
Laboratorio de Producción de Biológicos.
Número económico: 1156