

Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene

Identificación molecular de especies de *Nocardia* utilizando el gen *sodA*.

K. Sánchez-Herrera¹, H. Sandoval¹, D. Mouniee², N. Ramírez-Durán³, E. Bergeron², P. Boiron², N. Sánchez-Saucedo¹ and V. Rodríguez-Nava²

1) Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México City, Mexico, 2) 'Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment,' UMR, CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, CNRS ENVL UCBL, Lyon, France and 3) Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca City, Estado de México, Mexico

Abstract

Currently for bacterial identification and classification the *rrs* gene encoding 16S rRNA is used as a reference method for the analysis of strains of the genus *Nocardia*. However, it does not have enough polymorphism to differentiate them at the species level. This fact makes it necessary to search for molecular targets that can provide better identification. The *sodA* gene (encoding the enzyme superoxide dismutase) has had good results in identifying species of other *Actinomycetes*. In this study the *sodA* gene is proposed for the identification and differentiation at the species level of the genus *Nocardia*. We used 41 type species of various collections; a 386 bp fragment of the *sodA* gene was amplified and sequenced, and a phylogenetic analysis was performed comparing the genes *rrs* (1171 bp), *hsp65* (401 bp), *secA1* (494 bp), *gyrB* (1195 bp) and *rpoB* (401 bp). The sequences were aligned using the Clustal X program. Evolutionary trees according to the neighbour-joining method were created with the programs Phylo_win and MEGA 6. The specific variability of the *sodA* gene of the genus *Nocardia* was analysed. A high phylogenetic resolution, significant genetic variability, and specificity and reliability were observed for the differentiation of the isolates at the species level. The polymorphism observed in the *sodA* gene sequence contains variable regions that allow the discrimination of closely related *Nocardia* species. The clear specificity, despite its small size, proves to be of great advantage for use in taxonomic studies and clinical diagnosis of the genus *Nocardia*.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Resumen

Actualmente, para la identificación y clasificación bacteriana se utiliza como método de referencia la secuenciación del gen *rrs* que codifica al rRNA 16S, en el caso del análisis de cepas del género *Nocardia*, sin embargo, no tiene el suficiente polimorfismo para diferenciarlas a nivel de especie lo que hace necesaria la búsqueda de blancos moleculares que puedan proporcionar una mejor identificación. El gen *sodA* (que codifica la enzima superóxido dismutasa) ha tenido buenos resultados en la identificación de especies de otros Actinomicetos. En este estudio se propone para la identificación y diferenciación a nivel de especie del género *Nocardia*. Se utilizaron 41 especies Tipo de diversas colecciones, se amplificó y secuenció un fragmento de 386 pb del gen *sodA* y se realizó un análisis filogenético comparando los genes *rrs* (1171 pb), *hsp65*(401pb), *secA1* (494pb), *gyrB* (1195pb) y *rpoB* (401pb), las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal X, los árboles evolutivos de acuerdo con el método de "Neighbor-Joining" se hicieron con el programa Phylo_win y Mega 6. Se analizó la variabilidad específica del gen *sodA* del género *Nocardia* presentando una alta resolución filogenética, una variabilidad genética importante, especificidad y confiabilidad para la diferenciación de los aislados a nivel de especie. El polimorfismo observado en la secuencia del gen *sodA* contiene regiones variables que posibilitan la discriminación de especies de *Nocardia* estrechamente relacionadas, y una clara especificidad, a pesar de su pequeño tamaño, demostrando ser de gran ventaja para utilizarse en estudios taxonómicos y en el diagnóstico clínico del género *Nocardia*.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: *hsp65*, *Nocardia*, polymorphism, *rrs*, *sodA*

Mots-clés: Palabras clave, *Nocardia*, *sodA*, *hsp65*, *rrs*, polimorfismo

Original Submission: 8 November 2016; **Revised Submission:** 8 March 2017; **Accepted:** 21 March 2017

Article published online: 8 April 2017

Corresponding author: H. Sandoval, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud Del. Coyoacán C.P. 04960, Cd. de México, Mexico

E-mail: hsandov@correo.xoc.uam.mx

Introduction

Actinomycetes are Gram-positive bacteria, soil saprophytes that play an essential role in the processes of humification and decomposition of organic matter, and are also known for their ability to produce metabolites, such as antibiotics, antitumor agents, immunosuppressive agents and enzymes. Apart from their ecologic and industrial role, members of the genus *Nocardia* are responsible for infections such as nocardiosis and actinomycetoma [1,2]. Identification of the various species of *Nocardia* is no longer possible by standard methods such as conventional biochemical tests. Luckily, identification based on molecular tests is every day more promising.

In recent years the sequencing methodology used the *rrs* gene that encodes the 16S rRNA as a reference method to identify and classify strains of the genus *Nocardia* at the species level. However, some studies have reported that this gene does not have enough discriminatory power [3] or multiple copies of the *rrs* gene are present [4]; thus generating problems in the identification of clinical isolates [5].

Other genes have been used as novel genetic targets for the characterization of *Nocardia*, such as PCR amplification of a segment of the *hsp65* gene [6,7]; the *secA1* gene [8]; the gene *gyrB* [9]; the *rpoB* and the intergenic spacer 16S-23S, but they can not solve certain identification problems at the species level; nor can they differentiate between species that are closely related and difficult to separate.

The combined use of different genes makes it possible to refine phylogenetic analysis and provide a molecular basis for accurate identification at the species level. However, the use of these genes in a multiple analysis involves the sequencing of each gene for each isolate, which remains laborious and costly for certain diagnostic laboratories [10].

The amplification and sequencing of the *sodA* gene (gene encoding the enzyme superoxide dismutase) has been used by

Zolg and Philippi-Schulz [11] for species-level identification of *Mycobacterium* strains.

On this basis, we decided to explore the polymorphism of the *sodA* gene in the genus *Nocardia*. The objective of this study was to propose a new molecular target that may be useful for the identification and differentiation of clinical and environmental isolates at the species level of the genus *Nocardia* as well as to evaluate their efficiency.

Materials and Methods

We used 41 strains of the genus *Nocardia* from international collections, in which the *rrs* and *hsp65* genes absent in GenBank were sequenced. Sequences of the *secA1*, *rpoB* and *gyrB* genes were obtained completely from GenBank. The *sodA* gene of all strains was sequenced in our laboratory (Table 1).

Methods of DNA extraction

DNA extraction from type strains was performed with the commercial kit UltraClean Microbial DNA isolation kit Mobio, previously reported for bacteria of the order *Actinomycetales* by Soddell et al. [12]; with the exception of some species such as *N. nova*, *N. anaemiae* and *N. puris*, where the Chelex resin method was used because of problems of concentration and purity of DNA obtained with other methods.

Chelex resin

A bacterial suspension was prepared in an Eppendorf tube containing a dozen 1 mm glass beads and 250 µL of sterile ultrapure water which was homogenized for 5 minutes in a vortex, and 60 µL of Resin Chelex (InstaGene Matrix; 6% w/v Chelex Resin; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) which was previously agitated. The tubes were placed on a heat plate at 100°C for 25 minutes. It was then centrifuged at 10 000g for 5 minutes. Supernatant (200 µL) containing the DNA was taken and transferred to a sterile tube, then frozen at -20°C for storage.

UltraClean Microbial DNA isolation Kit Mobio

A total of 300 µL of the MicroBead solution were added to a MicroBead tube. Once the beads were wetted, the bacterial suspension was added to the tube. Next 50 µL of the MDI solution was added and the tubes were vortexed at the maximum rate for 10 minutes. The tubes were centrifuged at

TABLE 1. Accession numbers for six genes of different strains of *Nocardia* obtained from GenBank

No.	Species	Strain	Gene					
			<i>rrs</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrB</i>	<i>sodA</i>
1	<i>N. abscessus</i>	DSM 44432 ^T	DQ659895	AY544983	DQ360260	JN215593	AB447398	EPV ^a
2	<i>N. amamiensis</i>	DSM 45066 ^T	AB275164	JN041700	JN041937	JN215567	JN041226	JX519285 ^b
3	<i>N. anaemiae</i>	DSM 44821 ^T	JF797304	JN041769	JN042006	JN215636	AB447400	KX944462 ^b
4	<i>N. aobensis</i>	DSM 44805 ^T	JF797305	JN041852	JN042089	JN215719	AB447401	EPV
5	<i>N. arcaensis</i>	DSM 44729 ^T	JF797306	AY903636 ^b	EU178745	DQ085145	AB450768	DQ085169 ^b
6	<i>N. arthritidis</i>	DSM 44731 ^T	DQ659896	AY903633 ^b	JN041946	JN215576	AB450769	DQ085166 ^b
7	<i>N. asiatica</i>	DSM 44668 ^T	DQ659897	AY903631 ^b	DQ360263	JN215591	AB450770	DQ085165 ^b
8	<i>N. asteroides</i>	ATCC 19247 ^T	DQ659898	AY756513 ^b	DQ360267	JN215563	AB450771	DQ085146 ^b
9	<i>N. beijingensis</i>	JCM10666 ^T	DQ659901	AY756515 ^b	JN041942	JN215572	AB450772	DQ085147 ^b
10	<i>N. brasiliensis</i>	ATCC 19296 ^T	AF430038	AY756516 ^b	DQ360269	JN215639	AB450773	DQ085148 ^b
11	<i>N. brevicatena</i>	ATCC 15333 ^T	AF430040	AY756517 ^b	DQ360270	JN215692	AB450774	EPV
12	<i>N. carnea</i>	DSM 43397 ^T	AF430035	AY756518 ^b	DQ360271	JN215702	AB450782	EPV
13	<i>N. cerradoensis</i>	DSM 44546 ^T	NR_028704	AY756519 ^b	JN042082	JN215712	AB450777	EPV
14	<i>N. coubleae</i>	DSM 44960 ^T	DQ265689 ^b	DQ250024 ^b	JN041930	JN215560	JN041219	EPV
15	<i>N. cyriacigeorgica</i>	DSM 44484 ^T	AF430027	AY756522 ^b	DQ360272	JN215664	AB450784	EF408035 ^b
16	<i>N. exalbidia</i>	DSM 44883 ^T	JF797308	JN041715	GU584191	JN215582	AB447397	EPV
17	<i>N. farcinica</i>	DSM 43665 ^T	AF430033	AY756523 ^b	DQ360274	DQ085117	AB014169	JX519286 ^b
18	<i>N. flavorosea</i>	JCM3332 ^T	AF430048	AY756524 ^b	JN042071	JN215701	AB450787	EPV
19	<i>N. fluminea</i>	DSM 44489 ^T	AF430053	AY756525 ^b	JN041926	JN215556	AB450788	DQ085150 ^b
20	<i>N. gamkensis</i>	DSM 44956 ^T	DQ235272	JN041716	JN041953	JN215583	JN041242	JX519284 ^b
21	<i>N. higoensis</i>	DSM 44732 ^T	AB108778	AY903634 ^b	EU178747	DQ085142	AB450789	DQ085167 ^b
22	<i>N. ignorata</i>	DSM 44496 ^T	DQ659907	AY756526 ^b	JN041928	JN215558	AB450790	DQ085151 ^b
23	<i>N. inohanensis</i>	DSM 44667 ^T	AB092560	AY903625 ^b	DQ360276	DQ085133	AB450791	DQ085159 ^b
24	<i>N. mexicana</i>	CIP 108295 ^T	JF797310	AY903624 ^b	GU584192	DQ085132	GQ496104	EPV
25	<i>N. neocaledoniensis</i>	DSM 44717 ^T	AY282603	AY903628 ^b	JN041932	JN215562	AB450795	DQ085162 ^b
26	<i>N. niigatensis</i>	DSM 44670 ^T	DQ659910	AY903629 ^b	DQ360278	DQ085137	AB450796	DQ085163 ^b
27	<i>N. nova</i>	CIP 104777 ^T	AY756555 ^b	AY756527 ^b	DQ360279	JN215752	AB450797	EPV
28	<i>N. otitidiscaviarum</i>	ATCC 14629 ^T	AF430067	AY756528 ^b	DQ360280	JN215616	AB450798	EPV
29	<i>N. paucivirans</i>	DSM 44386 ^T	AF179865	AY756529 ^b	DQ360281	JN215691	AB450799	EPV
30	<i>N. pneumoniae</i>	DSM 44730 ^T	JF797313	AY903636 ^b	EU178749	JN215569	AB450801	EPV
31	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	DSM 44290 ^T	DQ659914	AY756530 ^b	DQ360282	JN215625	AB450802	DQ085152 ^b
32	<i>N. puris</i>	DSM 44599 ^T	JF797314	AY903632 ^b	EU178750	DQ085140	AB450804	EPV
33	<i>N. seriolae</i>	DSM 44129 ^T	AF430039	AY756533 ^b	DQ360284	DQ085125	AB450805	DQ085154 ^b
34	<i>N. shimofusensis</i>	DSM 44733 ^T	AB108775	AY903635 ^b	EU178751	DQ085143	AB450806	DQ085168 ^b
35	<i>N. sienata</i>	DSM 44766 ^T	NR_024825	JN041831	DQ360285	JN215698	AB450807	EPV
36	<i>N. thailandica</i>	DSM 44808 ^T	AB126874	JN041686	EU178752	JN215553	AB450811	EPV
37	<i>N. transvalensis</i>	DSM 43405 ^T	AF430047	AY756535 ^b	DQ360287	JN215628	AB450812	EPV
38	<i>N. vacinii</i>	DSM 43285 ^T	AF430045	AY756537 ^b	DQ366276	DQ085129	AB450814	EPV
39	<i>N. veterana</i>	DSM 44445 ^T	AF430055	AY756538 ^b	DQ360288	JN215706	AB450816	EPV
40	<i>N. vinacea</i>	JCM 10988 ^T	DQ659919	AY756539 ^b	DQ360289	JN215634	AB450817	DQ085158 ^b
41	<i>N. yamanashiensis</i>	DSM 44669 ^T	AB092561	AY903630 ^b	DQ360290	DQ085138	AB450819	DQ085164 ^b

ATCC, American Type Culture Collection; CIP, Collection de l'Institut Pasteur; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen; JCM, Japan Collection of Microorganisms.

^aEPV indicates sequences in process of validation in GenBank.

^bSequenced by our laboratory.

10 000g for 30 seconds. The supernatant was then transferred to a tube containing 100 µL of the MD2 solution, vortexed and allowed to incubate at 4°C for 15 minutes, after which the tubes were centrifuged at 10 000g for 1 minute. After this step, 200 µL of the supernatant was transferred to a tube containing 450 µL of the MD3 solution and vortexed for 2 minutes. Immediately 650 µL was transferred to a clean tube with filtration column, centrifuged at 10 000g for 30 seconds, the filtrate discarded and 300 µL of MD4 solution added to the filtration column, which was then centrifuged at 10 000g per 30 seconds. The filtrate column was placed in a 2.0 mL clean microtube, and 35 µL of the MD5 solution was added to the centre of the filter column (where it was allowed to incubate for 5 minutes at room temperature), then centrifuged at 10 000g for 30 seconds. The filtration column was discarded; the DNA was extracted and recovered in the microtube, then stored at -20°C until use.

Amplification and sequencing

Gene rrs (1171 bp). Sequencing of the *rrs* gene (16S rRNA) was performed using the following primers: SQ1 (5'-

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), SQ2 (5'-AAACTCAA-GRATTGACGGG-3'), SQ3 (5'-CCCGTCAATYCTTTGAG-TTT-3'), SQ4 (5'-CGTGCCAGCAGCCGCG-3'), SQ5 (5'-CGCGGCTGCTGGCAGC-3') and SQ6 (5'-CGGTGTGTA-CAAGCCCC-3') (0.2 µM) according to the Sanger method adapted by the DYE terminator sequencing kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The nucleotide sequences were determined with an automated sequencer ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions by the Biofidal (Vaux-en-Valin, France).

According to the recommendations of Rodríguez-Nava et al. [7]; the sequences were aligned using the Clustal X program [13]. The Phylo_win program [14] and MEGA 6 were used to infer the evolutionary trees according to the neighbour-joining method [15] and Kimura's two-parameter model [16]. The robustness of the tree was performed with a bootstrap of 1000 replicates.

Gene hsp65 (401 bp). A fragment of the *hsp65* gene encoding the 65 kDa heat shock protein was amplified and sequenced with the following primers: TB11, 5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT-3'

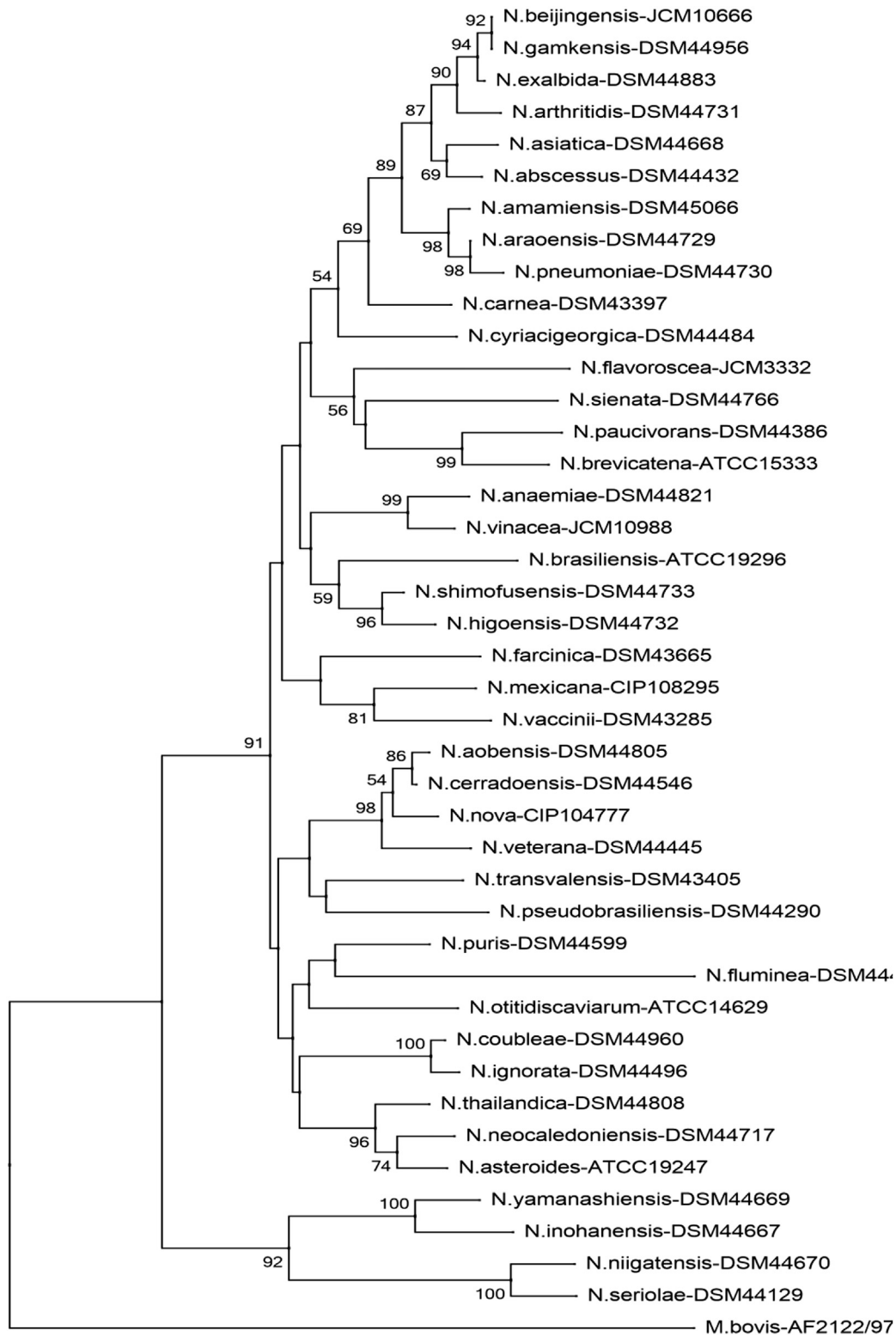


FIG. 1. Phylogenetic tree of *Nocardia* species (*sodA*). Phylogenetic distribution of *sodA* gene (386 bp) of 41 type *Nocardia* strains analysed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Clustal X, Phylo_win) were reported.

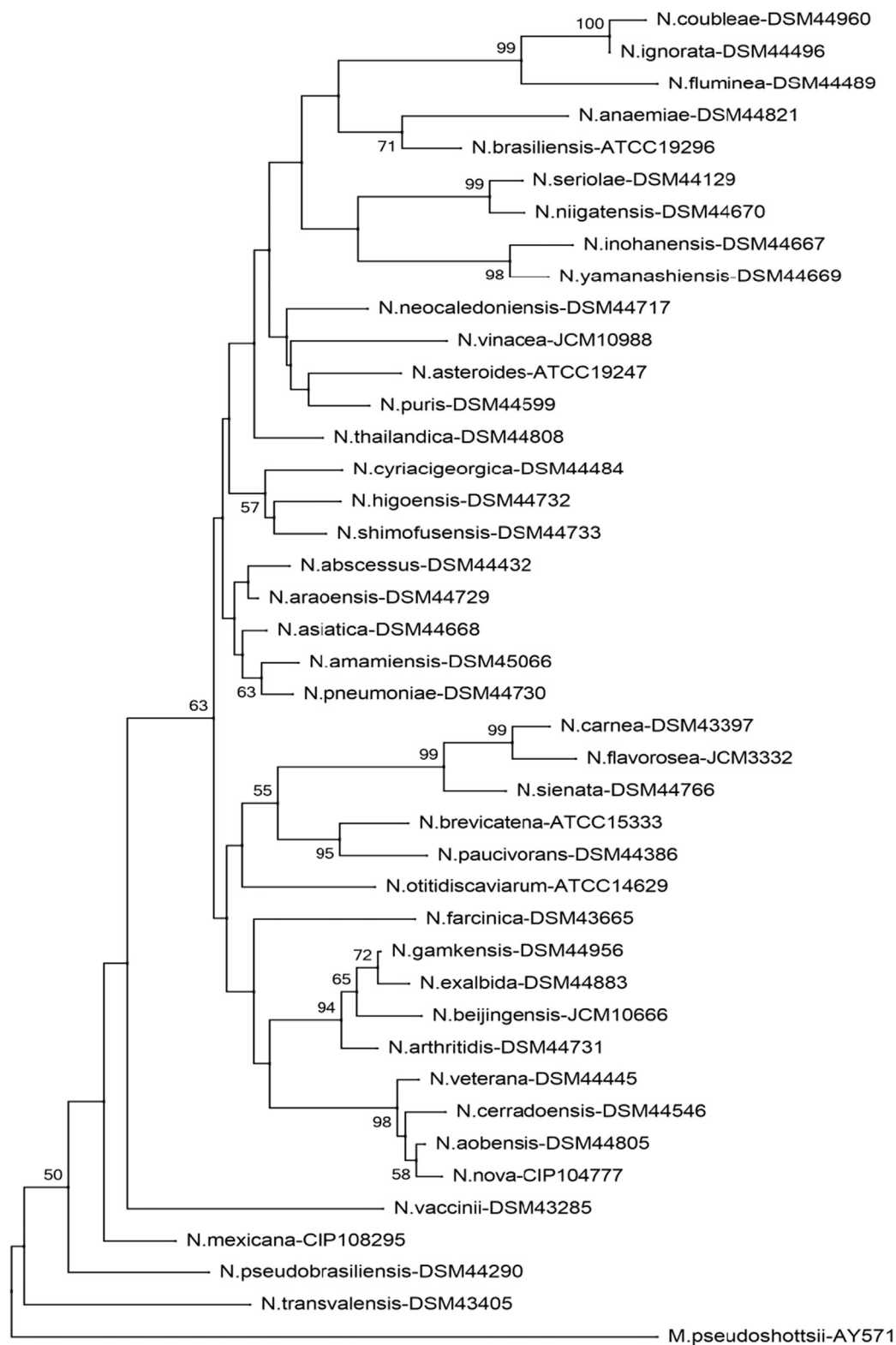


FIG. 2. Phylogenetic tree of *Nocardia* species (*hsp65*). Phylogenetic distribution of *hsp65* gene (401 bp) of 41 *Nocardia* type strains analysed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Clustal X, Phylo_win) were reported.

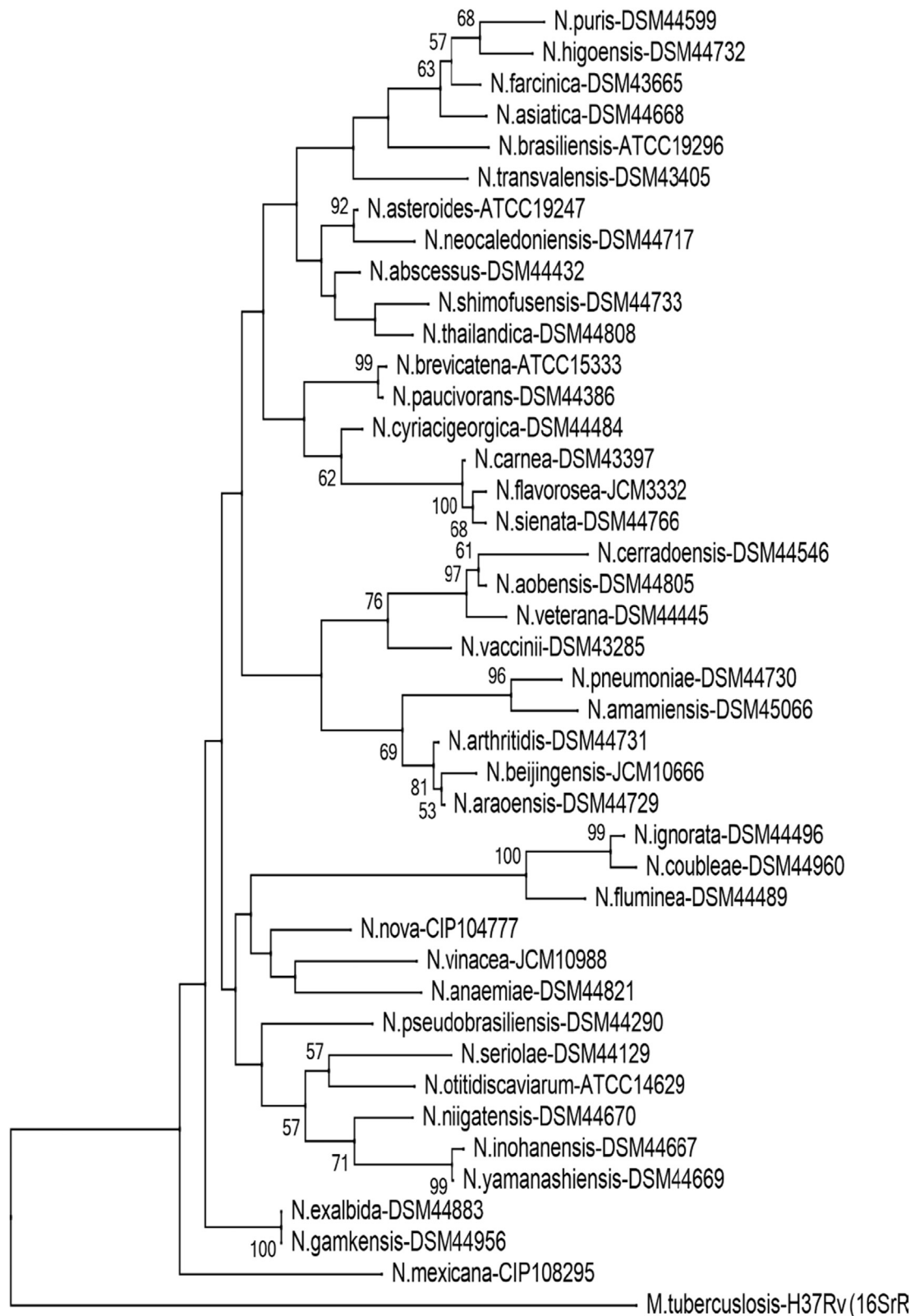


FIG. 3. Phylogenetic tree of *Nocardia* species (*rrs*). Phylogenetic distribution of *rrs* gene (1171 bp) of 41 strains of *Nocardia* analysed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Clustal X, Phylo_win) were reported.

TABLE 2. Phylogenetic analysis of different genes used

Characteristic	<i>rrs</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>
Phylogenetic resolution (%)	23.07	23.68	30.7	38.48	20.51	38.48
Gene size (bp)	1171	401	494	1195	401	386
Divergence in sequences (bp)	145 (12.38%)	114 (28.41%)	178 (36.03%)	530 (44.35%)	151 (37.65%)	168 (43.52%)
Total no. of nodes	39	38	39	39	39	39
No. of nodes $\geq 90\%$	9	9	12	15	8	15

and TB12 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3' (0.6 μ M) [17]. The amplification was carried out in Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare UK, Little Chalfont, UK) in a final volume of 25 μ L (2.5 U of Taq polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9) and 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 200 μ M of each desoxynucleoside triphosphate) with 10 μ L of the DNA extracted by the Chelex method. After initial denaturation at 94°C for 5 minutes, the reaction mixture was run for 35 denaturation cycles at 94°C for 60 seconds, the primers were aligned at 55°C for 60 seconds and the extension was carried out at 72°C for 60 seconds, followed by a postextension extension at 72°C for 5 minutes.

The nucleotide sequence, alignment and analysis of the sequences and the elaboration of the phylogenetic trees were performed under the same conditions described above for the *rrs* gene.

Gene *sodA* (386 bp). A 440 bp fragment of the *sodA* gene was amplified and sequenced with primers SodVI (5'-CAC CAY WSC AAG CAC CA-3') and SodV2 (5'-CCT TAG CGT TCT GGT ACT G-3') where Y = C or T, W = A or T and S = C or G (0.6 μ M) (V. Rodríguez-Nava, personal communication). Amplification was performed using both primers in PCR tubes (illustra puReTaq Ready-to-Go PCR Beads; GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA) under the same conditions as the *rrs* gene. Amplification was carried out in a thermocycler (PTC-100; MJ Research, Boston, MA, USA). The amplification run included an initial denaturation step of 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles (94°C for 60 seconds, 55°C for 60 seconds and 72°C for 60 seconds) and a final step of 10 minutes at 72°C. The sequences obtained were verified by DNA sequencing in both directions. The nucleotide sequence, alignment, sequence analysis and elaboration of phylogenetic trees was performed under the same conditions described above for the *rrs* gene).

Phylogenetic analysis

For the comparative phylogenetic analysis, the *sodA* gene as well as the *rrs* (1171 bp), *hsp65* (401 bp), *secA1* (494 bp), *gyrB* (1195 bp) and *rpoB* (401 bp) genes of the 41 *Nocardia* species studied were used. Several newly described species of the genus *Nocardia* were not included in this study because they were not available at the time we performed the phylogenetic analysis of the sequences.

Results

Phylogenetic analysis of sequences of *sodA* gene of 41 type strains

The *sodA* gene was successfully amplified in the 41 type species, and phylogenetic analysis of the amplicon sequences showed 15 nodes with bootstrap values of $\geq 90\%$ representing 38.46%, allowing a robust tree to be constructed. The percentage of minimum similarity found was 79.8% and had a maximum of 100%, which shows a high variability among species. The 386 bp fragment of the *sodA* gene presented variable regions, with segments of 4 and 5 bp, thus showing an interspecies variability of the *sodA* gene with the potential to be used as a molecular marker (Table 2).

Polymorphism analysis of different genes

The evolutionary analysis based on distance matrices allowed us to evaluate the interspecies polymorphism for each molecular marker used (*rrs*, *hsp65*, *secA1*, *gyrB*, *rpoB* and *sodA*). We found that the average percentage similarity for the *rrs* gene was 97.1%, corresponding to 145 nucleotides of difference between species at the interspecies level, whereas for the *sodA* gene it was 89.9%, corresponding to 168 nucleotides of difference. The variability of substitutions of the sequences of the *sodA* gene was much greater than those of the *rrs* gene (Table 2).

With the analysis of the sequences performed for the *sodA* gene, 15 nodes (38.48%) were found in the phylogenetic tree (bootstrap values of $\geq 90\%$), while for the other genes evaluated, nine nodes (23.07%) were obtained for the *rrs* gene, nine nodes (23.68%) for *hsp65*, 12 nodes (30.7%) for *secA1* and eight nodes (20.51%) for *rpoB*; for *gyrB*, we obtained 15 nodes and a tree robustness of 38.48%.

These results indicate that the *sodA* gene analysed on a 386 bp fragment compared to the standard *rrs* identification gene (1171 bp) presents a high resolution and polymorphism as a molecular marker, and presents a variability equivalent to the *gyrB* gene, with the difference that the *gyrB* gene corresponds to a bigger fragment of 1195 bp.

As already mentioned, the phylogeny of the genus *Nocardia* presents certain difficulties, which are reflected in several pairs of species that are hard to differentiate: *N. coubeae* and *N. ignorata*; and *N. bevicatena* and *N. paucivorans*.

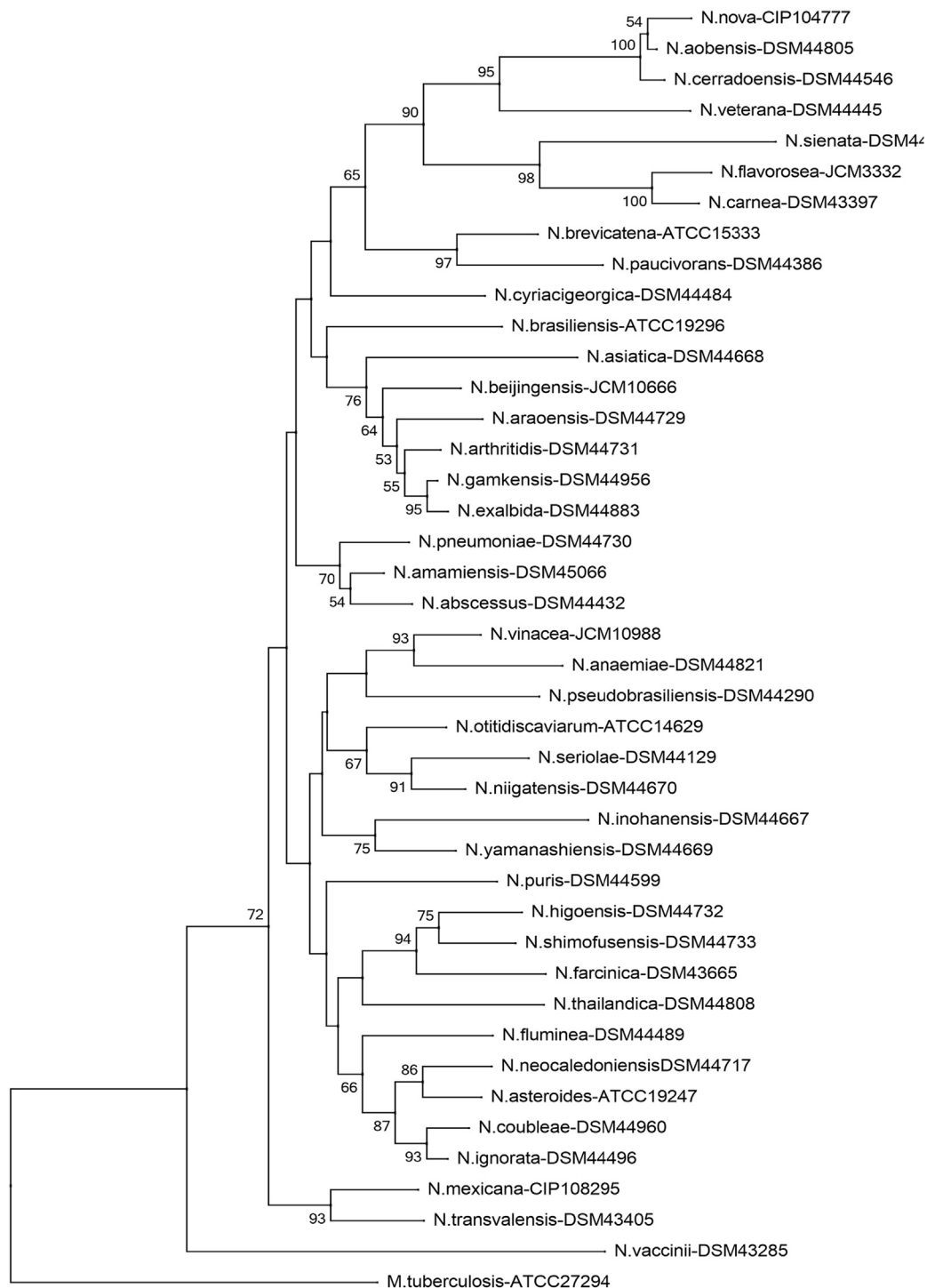


FIG. 4. Phylogenetic tree of *Nocardia* species (*secA1*). Phylogenetic distribution of *secA1* gene (494 bp) of 41 *Nocardia* type strains analysed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Clustal X, Phylo_win) were reported.

In order to make the phylogenetic analyses more clear and reproducible, all the trees were rooted, as far as possible, with bacteria of the same species. Species of the genus *Mycobacterium* were used.

Discussion

Sequencing of the *rrs* gene has been used as the reference method for the identification of *Nocardia* isolates [18,19,20,21].

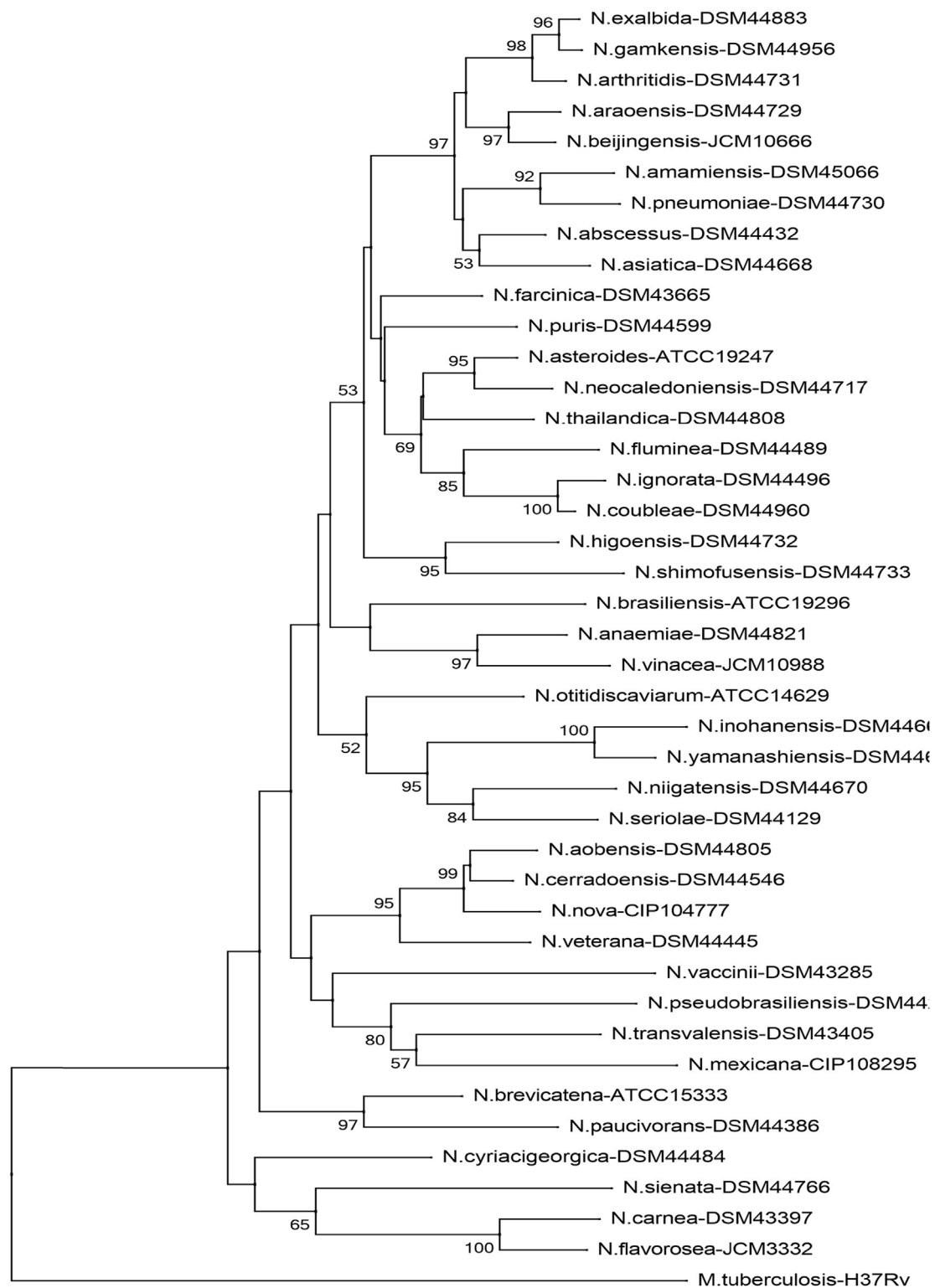


FIG. 5. Phylogenetic tree of *Nocardia* species (*gyrB*). Phylogenetic distribution of *gyrB* gene (1195 bp) of 41 *Nocardia* type strains analysed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Clustal X, Phylo_win) were reported.

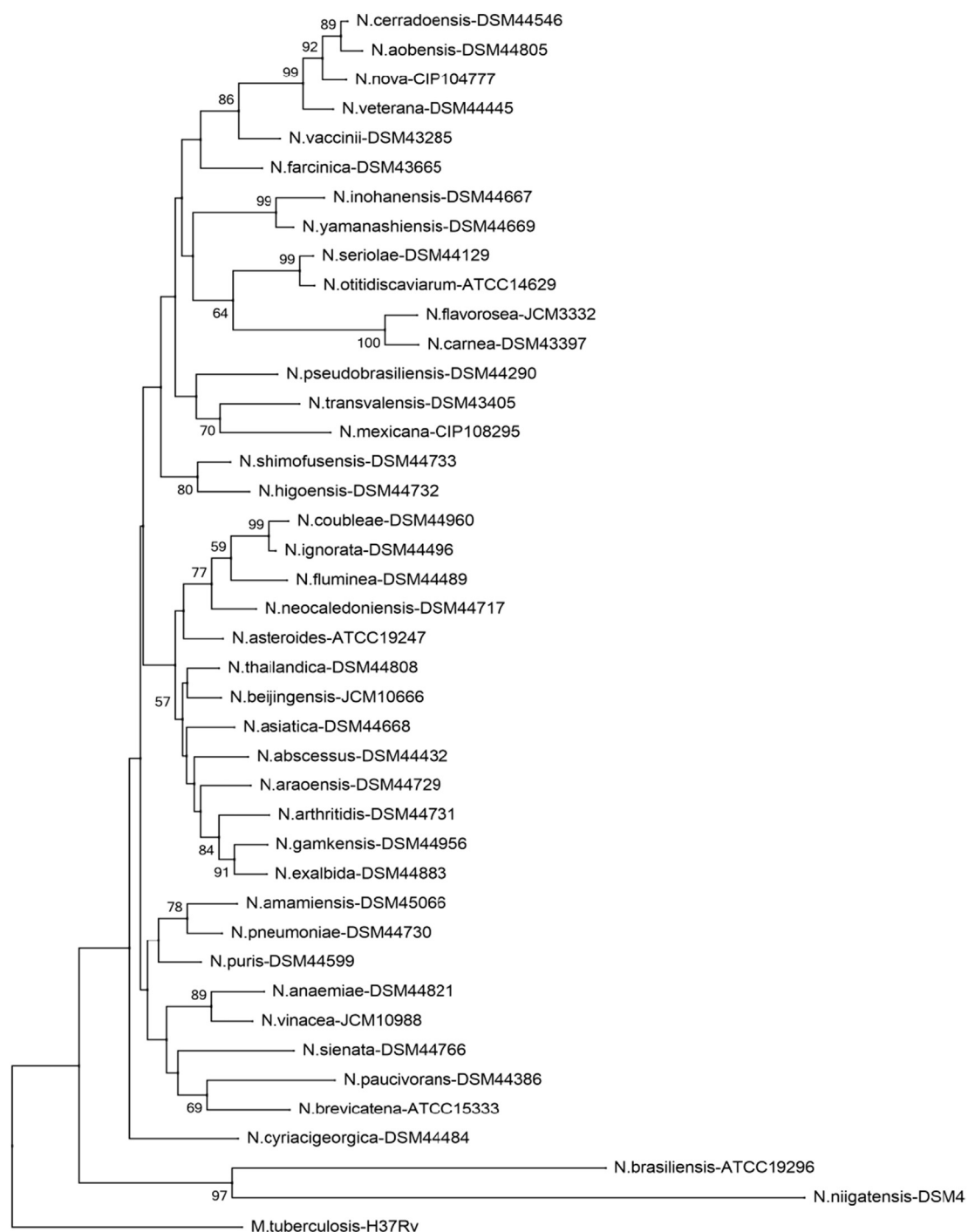


FIG. 6. Phylogenetic tree of *Nocardia* species (*rpoB*). Phylogenetic distribution of *rpoB* gene (401 bp) of 41 strains of *Nocardia* analysed in this study using neighbour-joining method, Kimura’s two-parameter model and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Clustal X, Phylo_win) were reported.

However, several studies have revealed the lack of polymorphism of the *rrs* gene to discriminate between certain closely related species [22]. In our study, the analysis of sequences with the *sodA* gene revealed an important interspecies

polymorphism for the 41 species of *Nocardia* analysed. It was found that the sequences have a variability of 43.52%, and that contains conserved and other highly variable regions in a small fragment of only 386 bp. It was also observed that it presents

the highest phylogenetic resolution (38.48%) compared to the genes already reported, including the reference gene, which presented a lower value (23.07%), except for the *gyrB* gene, with a resolution of 38.48% but with a large size, resulting in a complex analysis and expensive sequencing.

The phylogenetic distribution found for the *Nocardia* species obtained with the *sodA* gene was confirmed by the phylogenetic distribution of the *rrs* gene, confirming the distribution and position of the associations relative to each species within the tree. The clusters formed between the different species are also present in the other genes (*hsp65*, *secA1*, *gyrB* and *rpoB*) (Figs 1–6).

Conclusions

The specific variability of the *sodA* gene of the genus *Nocardia* was analysed. The gene proposed in this work as a molecular genetic marker presented a high phylogenetic resolution, an important genetic variability, and specificity and reliability for the differentiation of isolates at the species level. The polymorphism observed in the *sodA* gene sequence contains variable regions that enable discrimination of closely related *Nocardia* species.

We observed a clear specificity of the *sodA* gene, which we think will prove to be of great advantage for use in taxonomic studies; it could also be used for clinical diagnoses of the genus *Nocardia*.

Conflict of Interest

None declared.

References

- [1] Deshpande LM, Fritsche RN, Jones RN. Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: a global report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;4: 231–6.
- [2] Rodríguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F. *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *J Clin Microbiol* 2004;42:4530–5.
- [3] Yassin FA, Rainey AF, Burghardt J, Brzezinka H, Mauch M, Schaal PK. *Nocardia paucivorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:803–9.
- [4] Conville SP, Witebsky GF. Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *J Clin Microbiol* 2005;43:2881–5.
- [5] Conville SP, Witebsky GF. Analysis of multiple differing copies of the 16S rRNA gene in five clinical isolates and three type strains of *Nocardia* species and implications for species assignment. *J Clin Microbiol* 2007;45:1146–51.
- [6] Steingrube AV, Wilson WR, Brown AB, Jost Jr CK, Blacklock Z, Gibson LJ, et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic Actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and *Tsakamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:817–22.
- [7] Rodríguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois JP, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2006;44:536–46.
- [8] Conville SP, Zelazny MA, Witebsky GF. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2006;44: 2760–6.
- [9] Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* analyses. *J Med Microbiol* 2010;59: 165–71.
- [10] Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois PJ. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:293–302.
- [11] Zolg JW, Philippi-Schulz S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2801–12.
- [12] Soddell AJ, Stainsby MF, Eales LK, Kroppenstedt MR, Seviour JR, Goodfellow M. *Millisia brevis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56: 739–44.
- [13] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- [14] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 1996;12:543–8.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–25.
- [16] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–20.
- [17] Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31: 175–8.
- [18] Wilson WR, Steingrube AV, Brown AB, Wallace Jr RJ. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic Actinomycete isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:148–52.
- [19] Cloud LJ, Conville SP, Croft A, Harmsen D, Witebsky GF, Carroll CK. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004;42:578–84.
- [20] Brown MJ, Pham NK, McNeil MM, Lasker AB. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol* 2004;42: 3655–60.
- [21] Couble A, Rodríguez-Nava V, Pérouse de Montclos M, Boiron P, Laurent F. Direct detection of *Nocardia* spp. in clinical samples by a rapid molecular method. *J Clin Microbiol* 2005;43:1921–4.
- [22] Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *J Clin Microbiol* 2003;41:851–6.

Introducción

Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, saprofitas de suelo que juegan un papel esencial en los procesos de humificación y en la descomposición de la materia orgánica, así como también son conocidos por su capacidad de producir metabolitos, como: antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores y enzimas. Aparte de su papel ecológico e industrial, se les relaciona con infecciones como la Nocardiosis y el Actinomicetoma, siendo los miembros del género *Nocardia* los principales responsables [7,11]. La identificación de las diversas especies de *Nocardia* ya no es posible por métodos habituales como las pruebas bioquímicas convencionales. Es en este campo, en donde la identificación con base en pruebas moleculares es cada día más promisorio.

En los últimos años se ha empleado la metodología de secuenciación utilizando el gen *rrs* que codifica al rRNA16S como método de referencia para identificar y clasificar las cepas del género *Nocardia* a nivel de especie, sin embargo, algunos estudios han reportado que este gen no tiene suficiente polimorfismo para diferenciar entre ciertas especies, por lo que esto puede llevar a identificaciones erróneas, por ejemplo el que dos especies presenten 99.6% de similitud [19] o se presenten múltiples copias del gen *rrs* [4] generando problemas en la identificación de aislados clínicos [3].

Otros genes han sido utilizados como nuevos blancos genéticos para la caracterización de *Nocardia*, como la amplificación por PCR, de un segmento del gen *hsp65* [16,12], el gen *secA1* [5], el gen *gyrB* [17], el *rpoB* y el Espacio de la Región Intergénica 16S-23S (ITS), pero no pueden resolver ciertos problemas de identificación a nivel de especie, ni entre especies estrechamente relacionadas y difíciles de separar.

La utilización combinada de genes diferentes hace posible refinar el análisis filogenético y proporciona una base molecular para la identificación exacta a nivel de especie, no obstante la utilización de estos genes en un análisis múltiple implica la secuenciación de cada gen para cada aislado lo que continua siendo laborioso y costoso para ciertos laboratorios de diagnóstico [8].

La amplificación y secuenciación del gen *sodA* (gen que codifica la enzima superóxido dismutasa) se ha utilizado por [20] para la identificación a nivel de especie de cepas del género *Mycobacterium*.

Sobre esta base decidimos explorar el polimorfismo del gen *sodA* en el género *Nocardia*. El objetivo de este estudio es proponer un nuevo blanco molecular que pueda ser útil para la identificación y diferenciación de aislados clínicos y ambientales a nivel de especie del género *Nocardia* así como evaluar su eficiencia.

Materiales Y métodos

Se utilizaron 41 cepas Tipo del género *Nocardia* de colecciones internacionales, a las cuales fueron secuenciados los genes *rrs* y *hsp65* que no se encontraban en GenBank. Las secuencias de los genes *secA1*, *rpoB* y *gyrB*, fueron obtenidas completamente del GenBank. El gen *sodA* de todas las cepas fue secuenciado en nuestro laboratorio (Tabla 1).

Métodos de extracción de DNA.

La extracción de DNA de las cepas Tipo se realizó con el kit comercial el UltraClean™ Microbial DNA Isolation kit Mobio®, reportado previamente para bacterias del orden de los *Actinomycetales* por [15]; a excepción de algunas especies como *N. nova*, *N. anaemiae* y *N. puris*, donde se utilizó el método con la resina Chelex® debido a problemas de concentración y pureza del DNA, obtenido con otros métodos.

Resina Chelex®.

Se preparó una suspensión bacteriana en un tubo eppendorf que contuviera una decena de perlas de vidrio de 1 mm y 250 µL de agua ultra pura estéril, la cual se homogeneizó durante 5 min en un vortex, se le agregaron 60 µL de la Resina Chelex® (InstaGene™ Matrix, [6% p/v Resina Chelex] BioRad Laboratories) la cual se agitó previamente, los tubos se pusieron en una placa térmica a 100°C por 25 min. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, se tomaron 200 µL del sobrenadante que contenía el ADN y se transfirieron a un tubo estéril y se congelaron a -20°C para su conservación.

Kit UltraClean™ Microbial DNA isolation Mobio®

Se agregaron 300 µL de la solución MicroBead a un tubo MicroBead, una vez humectadas las cuentas se adicionó la suspensión bacteriana al tubo, se agregaron 50 µL de la solución MD1, se pusieron los tubos al vortex a una velocidad máxima durante 10 min, los tubos se centrifugaron a 10,000 x g por 30 seg. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo que contenía 100 µL de la solución MD2, se agitó con el vortex, se dejó incubar a 4°C durante 15 min, una vez pasado el tiempo los tubos se centrifugaron a 10,000 x g durante 1 min. Después de esta etapa se transfirieron 200 µL del sobrenadante a un tubo que contenía 450 µL de la solución MD3 y se pasaron por el vortex durante 2 minutos. Enseguida se transfirieron 650 µL a un tubo limpio con columna de filtración, se centrifugaron a 10,000 x g por 30 seg, se descartó el filtrado y se añadieron 300 µL de la solución MD4 a la columna de filtración, se centrifugó a 10,000 x g por 30 seg. Se colocó la columna de filtración en un microtubo limpio de 2.0 mL y se adicionan 35 µL de la solución MD5 en el centro de la columna del filtro (se dejó incubar 5

TABLA I. Números de acceso para 6 genes de las diferentes cepas tipo de *Nocardia* obtenidos del GenBank

Especie	Clave	Números de Acceso						sodA
		Gen						
		<i>rrs</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrB</i>		
1	<i>N. abscessus</i>	DSM 44432 ^T	DQ659895	AY544983	DQ360260	JN215593	AB447398	EPV
2	<i>N. amamiensis</i>	DSM 45066 ^T	AB275164	JN041700	JN041937	JN215567	JN041226	JX519285
3	<i>N. anaemiae</i>	DSM 44821 ^T	JF797304	JN041769	JN042006	JN215636	AB447400	KX944462
4	<i>N. aobensis</i>	DSM 44805 ^T	JF797305	JN041852	JN042089	JN215719	AB447401	EPV
5	<i>N. araoensis</i>	DSM 44729 ^T	JF797306	AY903637	EU178745	DQ085145	AB450768	DQ085169
6	<i>N. arthritidis</i>	DSM 44731 ^T	DQ659896	AY903633	JN041946	JN215576	AB450769	DQ085166
7	<i>N. asiatica</i>	DSM 44668 ^T	DQ659897	AY903631	DQ360263	JN215591	AB450770	DQ085165
8	<i>N. asteroides</i>	ATCC 19247 ^T	DQ659898	AY756513	DQ360267	JN215563	AB450771	DQ085146
9	<i>N. beijingensis</i>	JCM 10666 ^T	DQ659901	AY756515	JN041942	JN215572	AB450772	DQ085147
10	<i>N. brasiliensis</i>	ATCC 19296 ^T	AF430038	AY756516	DQ360269	JN215639	AB450773	DQ085148
11	<i>N. brevicatena</i>	ATCC 15333 ^T	AF430040	AY756517	DQ360270	JN215692	AB450774	EPV
12	<i>N. carnea</i>	DSM 43397 ^T	AF430035	AY756518	DQ360271	JN215702	AB450782	EPV
13	<i>N. cerradoensis</i>	DSM 44546 ^T	NR_028704	AY756519	JN042082	JN215712	AB450777	EPV
14	<i>N. coubleae</i>	DSM 44960 ^T	DQ265689	DQ250024	JN041930	JN215560	JN041219	EPV
15	<i>N. cyriacigeorgica</i>	DSM 44484 ^T	AF430027	AY756522	DQ360272	JN215664	AB450784	EF408035
16	<i>N. exalbida</i>	DSM 44883 ^T	JF797308	JN041715	GU584191	JN215582	AB447397	EPV
17	<i>N. farcinica</i>	DSM 43665 ^T	AF430033	AY756523	DQ360274	DQ085117	AB014169	JX519286
18	<i>N. flavorosea</i>	JCM 3332 ^T	AF430048	AY756524	JN042071	JN215701	AB450787	EPV
19	<i>N. fluminea</i>	DSM 44489 ^T	AF430053	AY756525	JN041926	JN215556	AB450788	DQ085150
20	<i>N. gamkensis</i>	DSM 44956 ^T	DQ235272	JN041716	JN041953	JN215583	JN041242	JX519284
21	<i>N. higoensis</i>	DSM 44732 ^T	AB108778	AY903634	EU178747	DQ085142	AB450789	DQ085167
22	<i>N. ignorata</i>	DSM 44496 ^T	DQ659907	AY756526	JN041928	JN215558	AB450790	DQ085151
23	<i>N. inohanensis</i>	DSM 44667 ^T	AB092560	AY903625	DQ360276	DQ085133	AB450791	DQ085159
24	<i>N. mexicana</i>	CIP 108295 ^T	JF797310	AY903624	GU584192	DQ085132	GQ496104	EPV
25	<i>N. neocaledoniensis</i>	DSM 44717 ^T	AY282603	AY903628	JN041932	JN215562	AB450795	DQ085162
26	<i>N. niigatensis</i>	DSM 44670 ^T	DQ659910	AY903629	DQ360278	DQ085137	AB450796	DQ085163
27	<i>N. nova</i>	CIP 104777 ^T	AY756555	AY756527	DQ360279	JN215752	AB450797	EPV
28	<i>N. otitidiscaeviarum</i>	ATCC 14629 ^T	AF430067	AY756528	DQ360280	JN215616	AB450798	EPV
29	<i>N. paucivorans</i>	DSM 44386 ^T	AF179865	AY756529	DQ360281	JN215691	AB450799	EPV
30	<i>N. pneumoniae</i>	DSM 44730 ^T	JF797313	AY903636	EU178749	JN215569	AB450801	EPV
31	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	DSM 44290 ^T	DQ659914	AY756530	DQ360282	JN215625	AB450802	DQ085152
32	<i>N. puris</i>	DSM 44599 ^T	JF797314	AY903632	EU178750	DQ085140	AB450804	EPV
33	<i>N. serialae</i>	DSM 44129 ^T	AF430039	AY756533	DQ360284	DQ085125	AB450805	DQ085154
34	<i>N. shimofusensis</i>	DSM 44733 ^T	AB108775	AY903635	EU178751	DQ085143	AB450806	DQ085168
35	<i>N. sienta</i>	DSM 44766 ^T	NR_024825	JN041831	DQ360285	JN215698	AB450807	EPV
36	<i>N. thailandica</i>	DSM 44808 ^T	AB126874	JN041686	EU178752	JN215553	AB450811	EPV
37	<i>N. transvalensis</i>	DSM 43405 ^T	AF430047	AY756535	DQ360287	JN215628	AB450812	EPV
38	<i>N. vacinii</i>	DSM 43285 ^T	AF430045	AY756537	DQ366276	DQ085129	AB450814	EPV
39	<i>N. veterana</i>	DSM 44445 ^T	AF430055	AY756538	DQ360288	JN215706	AB450816	EPV
40	<i>N. vinacea</i>	JCM 10988 ^T	DQ659919	AY756539	DQ360289	JN215634	AB450817	DQ085158
41	<i>N. yamanashiensis</i>	DSM 44669 ^T	AB092561	AY903630	DQ360290	DQ085138	AB450819	DQ085164

*Todas las claves en "negritas" son cepas secuenciadas por nuestro laboratorio.*EPV: secuencias en proceso de validación en GenBank.

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, JCM: Japan Collection of Microorganisms; ATCC: American Type Culture Collection; CIP: Collection de l'Institut Pasteur

min a temperatura ambiente) se centrifugó a 10,000 x g por 30 seg. La columna de filtración se desechó, el DNA extraído y recuperado en el microtubo se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación y secuenciación

Gen *rrs* (1171 pb). La secuenciación del gen *rrs* (16SrRNA) se efectuó utilizando los "primers": SQ1 (5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3'), SQ2 (5'-AAACTCAAAGRATTGACGGG-3'), SQ3 (5'-CCCCTCAATYCTTTGAGTTT-3'), SQ4 (5'-CGTGCCAGCAGCCGCG-3'), SQ5 (5'-CGCGGCTGCTGGCACG-3') y SQ6 (5'-CGGTGTGTACAAGGCC-3') [0.2 µM] según el método de Sanger adaptado por el kit de secuenciación DYE terminador (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Las secuencias de nucleótidos se determinaron con un secuenciador automatizado ABI 377 (Foster City, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (PE Applied Biosystems) por la empresa BIOFIDAL (Vaux-en-Velin, Francia).

De acuerdo a las recomendaciones de [12]; las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal X [21], el programa Phylo_win [9] y Mega 6 se usaron para inferir los árboles evolutivos de acuerdo con el método de "Neighbor-Joining" [14], los algoritmos de Kimura 2 Parámetros [10], la robustez del árbol se realizó con un bootstrap de 1,000 réplicas.

Gen *hsp65* (401 pb).. Se amplificó y secuenció un fragmento del gen *hsp65* que codifica la proteína de choque térmico de 65-kDa con los "primers" (TB11, 5'-ACCAACGATGGTGTG-TCCAT-3' TB12, 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') [0.6 µM] [22]. La amplificación se llevó a cabo en tubos de PCR listos para usarse (Ready-to-Go PCR Beads; illustra™ GE Healthcare UK Limited; Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) en un volumen final de 25 µL (2.5 U de Taq polimerasa "pure Taq", 10 mM de Tris-HCl [pH 9], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato) con 10 µL del DNA extraído por medio del método

Chelex®. Después de la desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, la mezcla de reacción se corrió durante 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 s, los “primers” se alinean a 55°C por 60 s, y la extensión de los “primers” se lleva a cabo a 72°C por 60 s, seguido de una extensión de postamplificación a 72 °C por 5 min.

La secuencia de nucleótidos, la alineación y análisis de las secuencias y la elaboración de los árboles filogenéticos se realizó en las mismas condiciones utilizadas para el gen *rrs*, mencionadas anteriormente.

Gen sodA (386 pb). Un fragmento de 440 pb del gen *sodA* se amplificó y secuenció con los “primers” SodVI (5'-CAC CAY WSC AAG CAC CA-3') y SodV2 (5'-CCT TAG CGT TCT GGT ACT G-3') donde Y= C ó T, W = A ó T y S = C ó G [0.6 µM] (Rodríguez-Nava V. Comunicación personal), la amplificación se realizó empleando ambos “primers” en tubos de PCR (illustra™ puReTaq Ready-to-Go PCR Beads; GE Healthcare Bio-sciences, Piscataway, N.J.) en las mismas condiciones que el gen *rrs*. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100; MJ Research, Boston, Mass.). La corrida de amplificación incluyó un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos (94°C por 60 s, 55°C por 60 s, y 72°C por 60 s), y un paso final de 10 min a 72°C.

Las secuencias obtenidas fueron verificadas por la secuenciación del DNA en ambos sentidos. La secuencia de nucleótidos, la alineación, análisis de las secuencias y la elaboración de los árboles filogenéticos se realizó en las mismas condiciones utilizadas para el gen *rrs*, mencionadas anteriormente.

Análisis filogenético.

Para el análisis filogenético comparativo del gen *sodA* se utilizaron los genes *rrs* (1171 pb) *hsp65* (401 pb) *secA1* (494 pb), *gyrB* (1195 pb) y *rpoB* (401 pb) de las 41 especies de *Nocardia* estudiadas. Varias especies recién descritas del género *Nocardia* no fueron incluidas en este estudio debido a que no estaban disponibles al momento de realizar el análisis filogenético de las secuencias.

Resultados

Análisis filogenético de las secuencias del gen *sodA* de las 41 cepas Tipo.

Fue amplificado satisfactoriamente el gen *sodA* de las 41 especies Tipo, el análisis filogenético de las secuencias de los amplicones mostró en el árbol filogenético 15 nodos con “bootstraps” mayor o igual a 90% que representan el 38.46% lo que permite construir un árbol robusto. El porcentaje de similitud mínimo encontrado fue de 79.8% y el máximo de 100% lo que demuestra una alta variabilidad entre las especies, el fragmento de 386 pb del gen *sodA*, presentó regiones variables con segmentos de 4 y 5 pb, lo que muestra una variabilidad interespecie del gen *sodA* con potencialidad para usarse como marcador molecular. (Tabla 2)

Análisis del polimorfismo para los diferentes genes comparados.

El análisis evolutivo basado en matrices de distancias nos permitió evaluar el polimorfismo interespecie para cada marcador molecular utilizado (*rrs*, *hsp65*, *secA1*, *gyrB*, *rpoB* y *sodA*). Encontramos que el porcentaje de similitud promedio para el gen de *rrs* fue de 97.1% que corresponde a 145 nucleótidos de diferencia entre las especies a nivel de interespecie, mientras que para el gen *sodA* fue de 89.9% que corresponden a 168 nucleótidos de diferencia. La variabilidad de sustituciones de las secuencias del gen *sodA* fue mucho mayor de aquéllas del gen *rrs*, (Tabla 2).

Con el análisis de las secuencias realizado para el gen *sodA* se encontraron 15 nodos (38.48%) en el árbol filogenético (bootstraps \geq 90%), mientras para los demás genes evaluados se obtuvieron 9 nodos (23.07%) para el gen *rrs*, 9 nodos (23.68%) para el *hsp65*, 12 nodos (30.7%) para *secA1* y 8 nodos (20.51%) para *rpoB*, y para *gyrB*, obtuvimos 15 nodos y un porcentaje de robustez del árbol de 38.48%.

Lo que indica que el gen *sodA* analizado sobre un fragmento de 386 pb comparado con el gen estándar de identificación *rrs* (1171 pb) presenta una alta resolución y polimorfismo como marcador molecular y presenta una variabilidad equivalente al

TABLA 2. “Análisis filogenético de los diferentes genes utilizados”

Gen	<i>rrs</i>	<i>hsp65</i>	<i>secA1</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>
Resolución filogenética	23.07%	23.68%	30.7%	38.48%	20.51%	38.48%
Tamaño del gen	1171pb	401pb	494pb	1195pb	401pb	386pb
pb divergentes en las secuencias	145 (12.38%)	114 (28.41%)	178 (36.03%)	530 (44.35%)	151 (37.65%)	168 (43.52%)
Nodos totales	39	38	39	39	39	39
Nodos \geq 90%	9	9	12	15	8	15

gen *gyrB*, con la diferencia que el gen *gyrB* corresponde a un fragmento de talla superior con 1195 pb.

Como ya fue mencionado la filogenia del género *Nocardia* presenta ciertas dificultades lo que se ve reflejado en varias

parejas de especies que ningún gen pudo definir como son: *N.coupleae/N.ignorata*, *N.bevicatena/N.paucivorans*.

Con el objeto de hacer los análisis filogenéticos más claros y reproducibles, todos los árboles fueron enraizados, en la

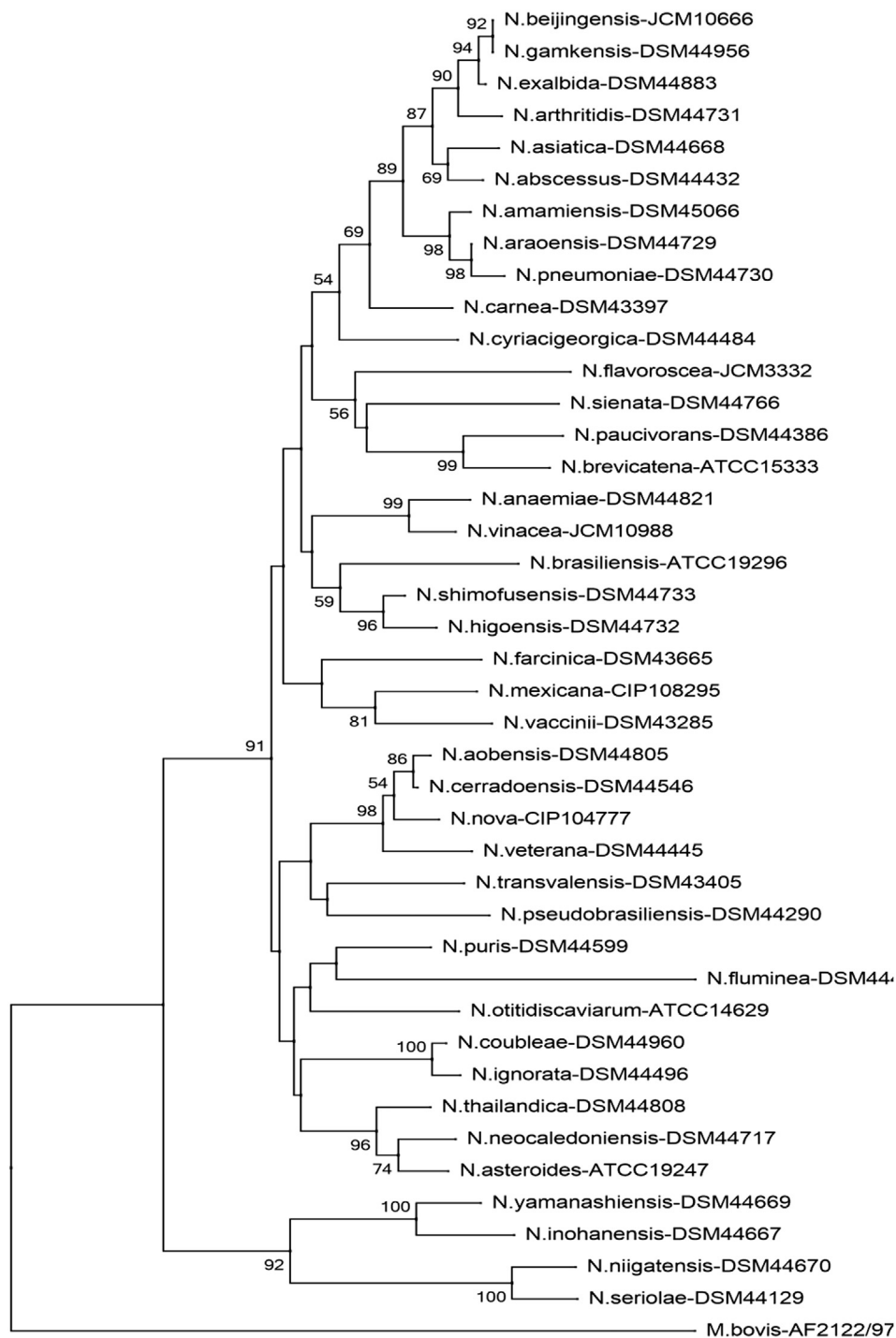


FIG 1. Árbol filogenético de especies de *Nocardia* (*sodA*). Distribución filogenética del gen *sodA* (386 pb) de las 41 cepas tipo de *Nocardia* analizadas en este estudio. Usando el método de neighbor-joining, el modelo de dos parámetros de Kimura y un bootstrap de 1000. Se indicaron solo los valores de significancia de bootstrap mayores de 50% (programas: Clustal X, Phylo_win)

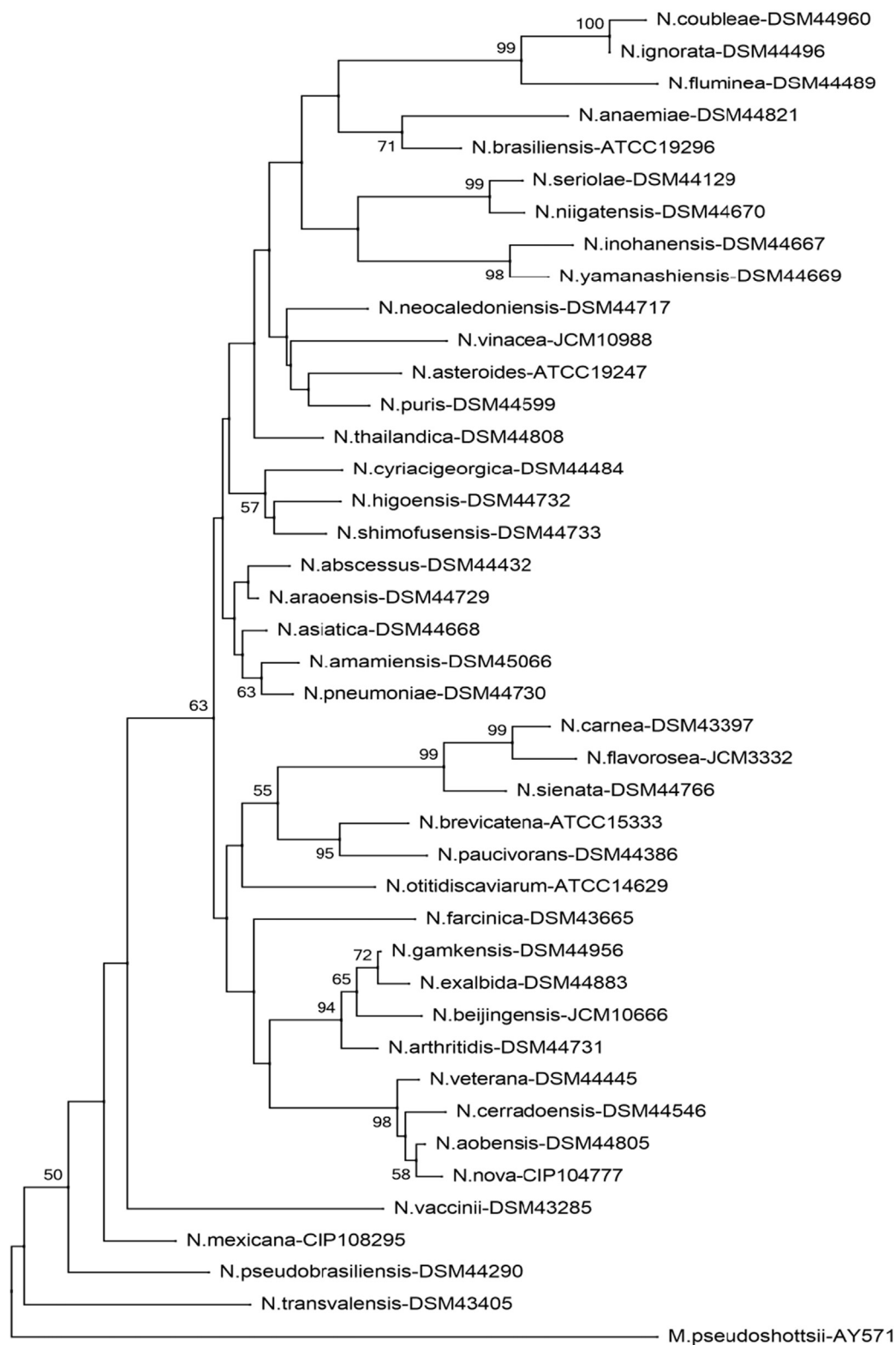


FIG 2. Árbol filogenético de especies de *Nocardia* (*hsp65*). Distribución filogenética del gen *hsp65* (401 pb) de las 41 cepas tipo de *Nocardia* analizadas en este estudio. Usando el método de neighbor-joining, el modelo de dos parámetros de Kimura y un bootstrap de 1000. Se indicaron solo los valores de significancia de bootstrap mayores de 50% (programas: Clustal X, Phylo_win).

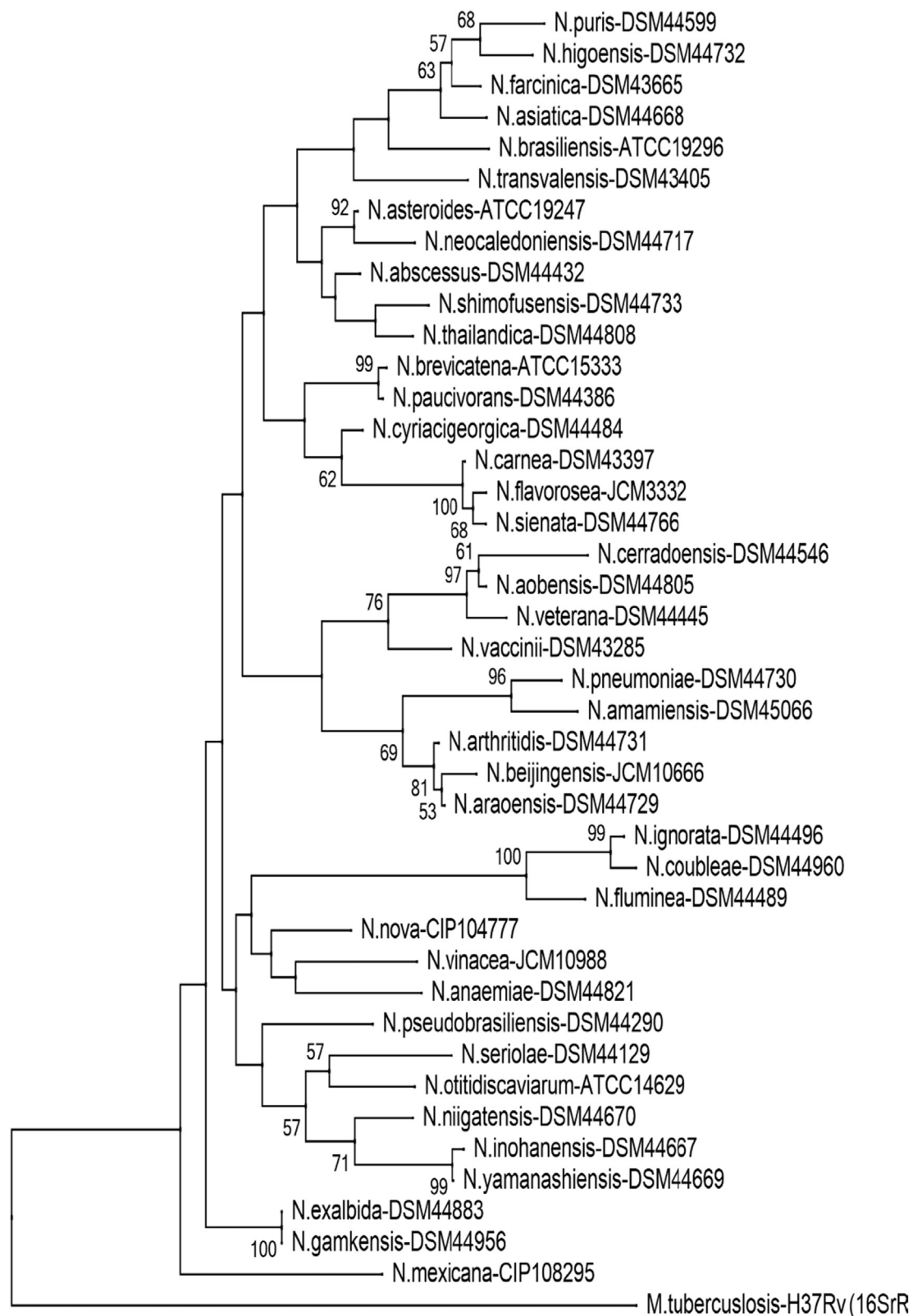


FIG 3. Árbol filogenético de especies de *Nocardia* (*rrs*). Distribución filogenética del gen *rrs* (1171 pb) de las 41 cepas tipo de *Nocardia* analizadas en este estudio. Usando el método de neighbor-joining, el modelo de dos parámetros de Kimura y un bootstrap de 1000. Se indicaron solo los valores de significancia de bootstrap mayores de 50% (programas: Clustal X, Phylo_win).

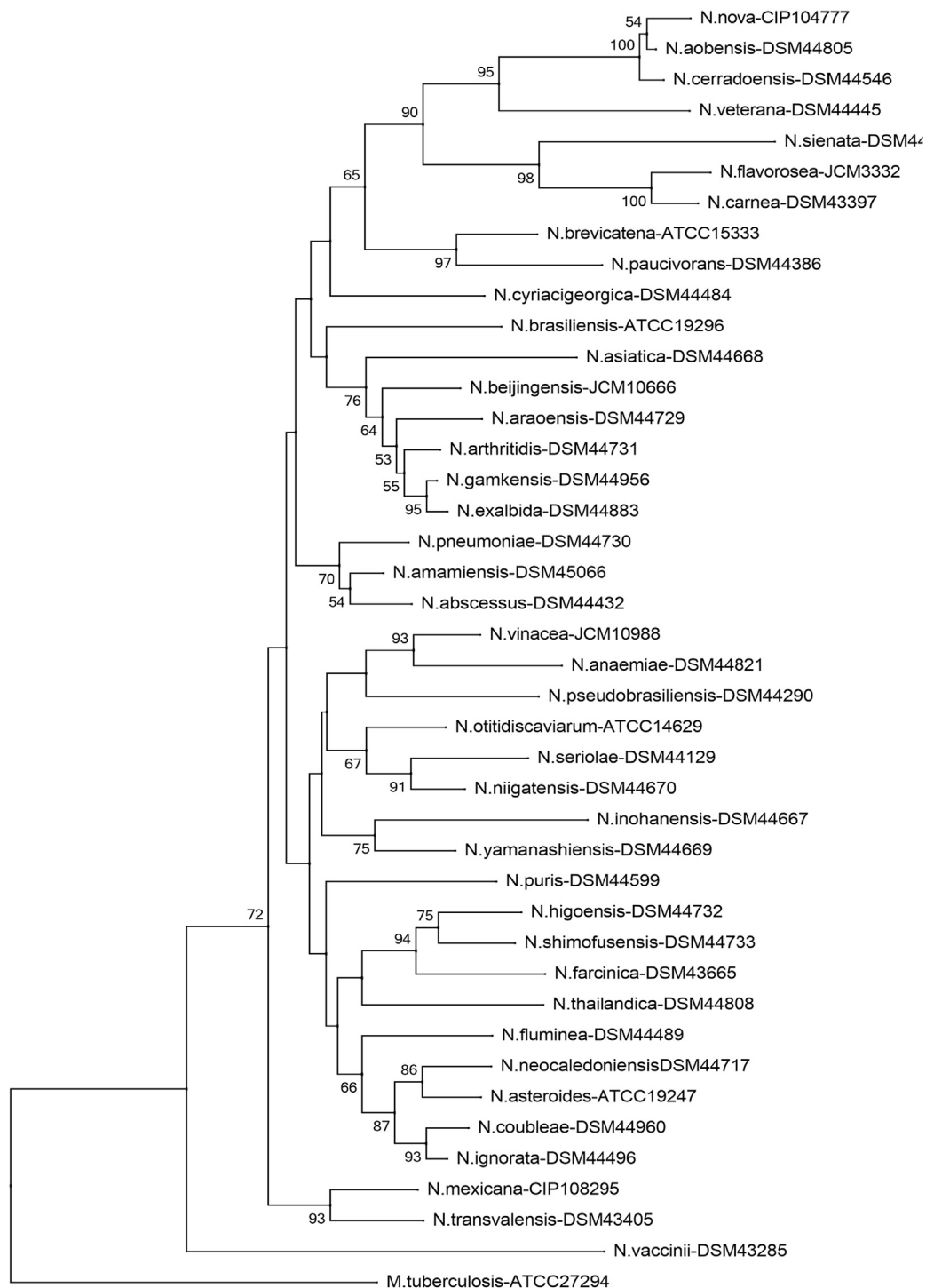


FIG 4. Árbol filogenético de especies de *Nocardia* (*secA1*). Distribución filogenética del gen *secA1* (494 pb) de las 41 cepas tipo de *Nocardia* analizadas en este estudio. Usando el método de neighbor-joining, el modelo de dos parámetros de Kimura y un bootstrap de 1000. Se indicaron solo los valores de significancia de bootstrap mayores de 50% (programas: Clustal X, Phylo_win)

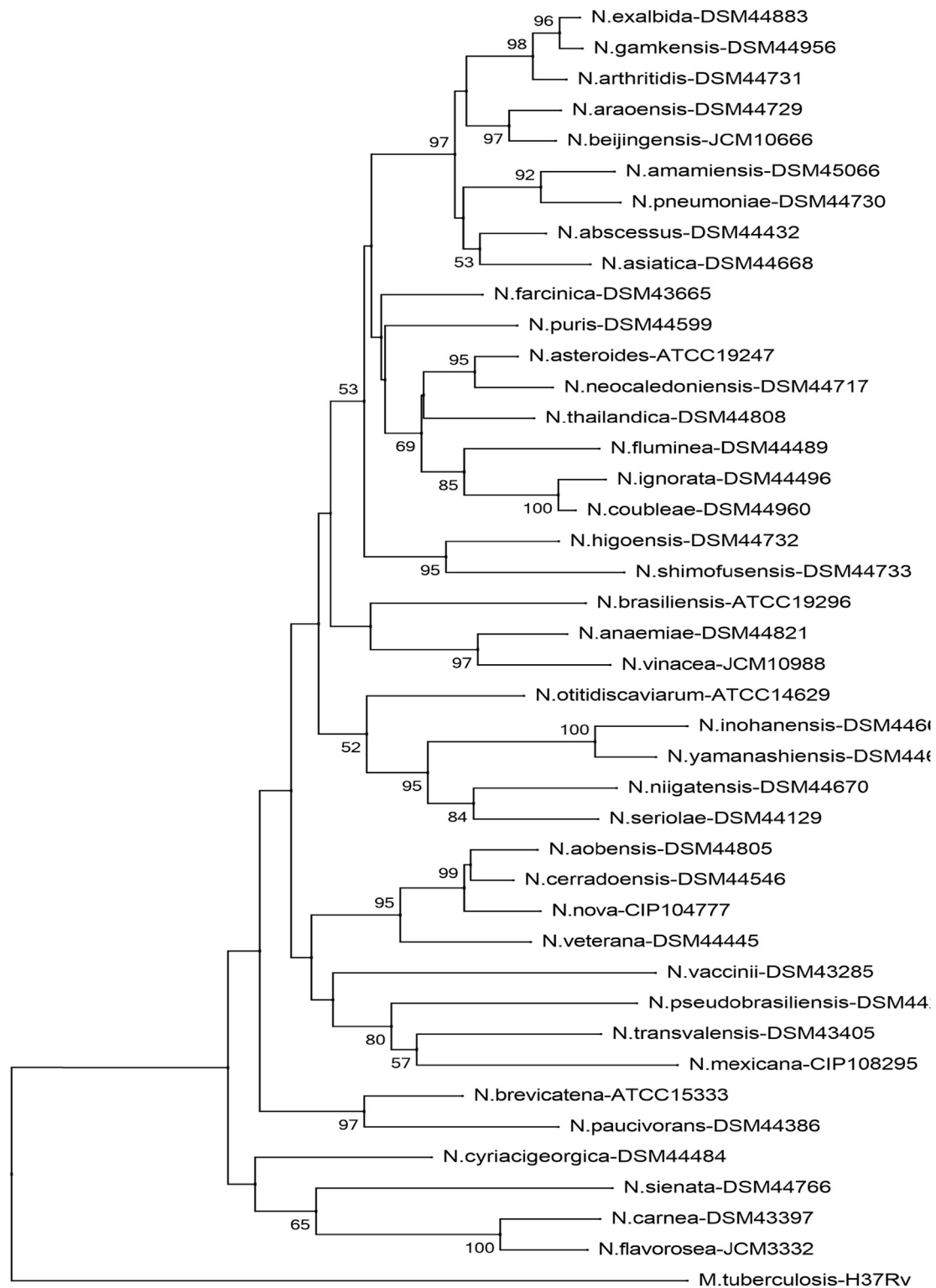


FIG 5. Árbol filogenético de especies de *Nocardia* (*gyrB*). Distribución filogenética del gen *gyrB* (1195 pb) de las 41 cepas tipo de *Nocardia* analizadas en este estudio. Usando el método de neighbor-joining, el modelo de dos parámetros de Kimura y un bootstrap de 1000. Se indicaron solo los valores de significancia de bootstrap mayores de 50% (programas: Clustal X, Phylo_win)

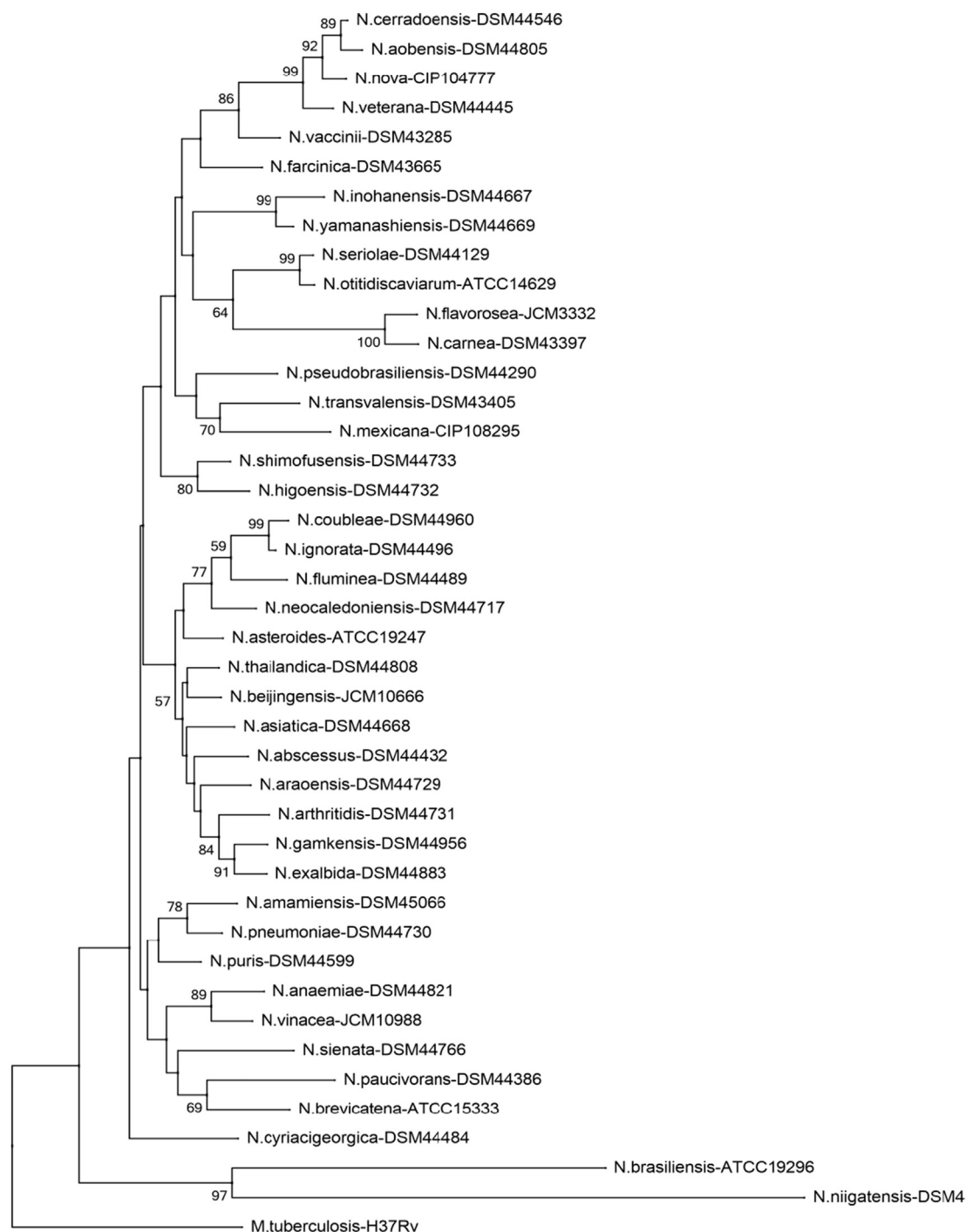


FIG 6. Árbol filogenético de especies de *Nocardia* (*rpoB*). Distribución filogenética del gen *rpoB*(401 pb) de las 41 cepas tipo de *Nocardia* analizadas en este estudio. Usando el método de neighbor-joining, el modelo de dos parámetros de Kimura y un bootstrap de 1000. Se indicaron solo los valores de significancia de bootstrap mayores de 50% (programas: Clustal X, Phylo_win)

medida de lo posible, con bacterias de la misma especie, por lo que se usaron especies del género *Mycobacterium*.

Se muestran los árboles filogenéticos de los genes: *sodA* (Fig. 1), *hsp65* (Fig. 2), *rrs* (Fig. 3), *secA1* (Fig. 4), *gyrB* (Fig. 5) y *rpoB* (Fig. 6).

Discusión

La secuenciación del gen *rrs* se ha utilizado como el método de referencia para la identificación de aislados de *Nocardia*

[18,2,1,6] además de su uso en la descripción de nuevas especies. Sin embargo, diversos estudios han revelado la falta de polimorfismo del gen *rrs* para discriminar entre ciertas especies estrechamente relacionadas [13]. En nuestro estudio el análisis de las secuencias con el gen *sodA*, reveló un importante polimorfismo interespecie para las 41 especies Tipo de *Nocardia* analizadas. Se encontró que las secuencias poseen una variabilidad del 43.52%, y que contiene regiones conservadas y otras altamente variables en un pequeño fragmento de tan solo 386 pb, asimismo se observó que presenta la mayor resolución filogenética (38.48%) comparada con los genes ya reportados, e incluso con el gen de referencia que presentó un valor más bajo (23.07%). Excepto por el gen *gyrB* con resolución de 38.48%, sin embargo su gran tamaño da como resultado un análisis complejo y una secuenciación costosa.

La distribución filogenética encontrada para las especies de *Nocardia* obtenidas con el gen *sodA*, se ratifica con la distribución filogenética del gen *rrs*, en ella se confirman la distribución y las posiciones de las asociaciones relativas a cada especie dentro del árbol. Los “clústeres” formados entre las diversas especies se presentan también con los demás genes (*hsp65*, *secA1*, *gyrB* y *rpoB*).

Conclusiones

Se analizó la variabilidad específica del gen *sodA* del género *Nocardia* y se encontró que: El gen propuesto en este trabajo como marcador molecular genético presentó una alta resolución filogenética, una variabilidad genética importante, especificidad y confiabilidad para la diferenciación de los aislados a nivel de especie.

El polimorfismo observado en la secuencia del gen *sodA* contiene regiones variables que posibilitan la discriminación de especies de *Nocardia* estrechamente relacionadas.

Se observó una clara especificidad del gen *sodA*, demostró ser de gran ventaja para utilizarse en estudios taxonómicos y en estudios posteriores podría usarse para el diagnóstico clínico del género *Nocardia*

Bibliografía

- [1] Brown MJ, Pham NK, McNeil MM, Lasker AB. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol* 2004;42:3655–60.
- [2] Cloud LJ, Conville SP, Croft A, Harmsen D, Witebsky GF, Carroll CK. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004;42:578–84.
- [3] Conville SP, Witebsky GF. Analysis of multiple differing copies of the 16S rRNA gene in five clinical isolates and three type strains of *Nocardia* species and implications for species assignment. *J Clin Microbiol* 2007;45:1146–51.
- [4] Conville SP, Witebsky GF. Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *J Clin Microbiol* 2005;43:2881–5. 132.
- [5] Conville SP, Zelazny MA, Witebsky GF. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2006;44:2760–6.
- [6] Couble A, Rodríguez-Nava V, Pérouse de Montclos M, Boiron P, Laurent F. Direct detection of *Nocardia* spp. in clinical samples by a rapid molecular method. *J Clin Microbiol* 2005;43:1921–4.
- [7] Deshpande LM, Fritsche, Jones RN. Molecular epidemiology of selected multidrug-resistant bacteria: a global report from the SENTRY antimicrobial surveillance. *Program Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;4:231–6.
- [8] Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois PJ. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:293–302.
- [9] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 1996;12:543–8.
- [10] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–20.
- [11] Rodríguez-Nava V, Couble A, Molinard C, Sandoval H, Boiron P, Laurent F. *Nocardia mexicana* sp. nov. a new pathogen isolated from human mycetomas. *J Clin Microbiol* 2004;42:4530–5.
- [12] Rodríguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois J-P, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2006;44:536–46.
- [13] Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. “Phylogeny of the Genus *Nocardia* Based on Reassessed 16S rRNA Gene Sequences Reveals Underspeciation and Division of Strains Classified as *Nocardia asteroides* into Three Established Species and Two Unnamed Taxons”. *J Clin Microbiol* 2003;41:851–6.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–25.
- [15] Soddell AJ, Stainsby MF, Eales LK, Kroppenstedt MR, Seviour JR, Goodfellow M. *Millisia brevis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:739–44.
- [16] Steingrube AV, Wilson WR, Brown AB, Jost Jr CK, Blacklock Z, Gibson LJ, et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic Actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 1997;35:817–22.
- [17] Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* analyses. *J Med Microbiol* 2010;59:165–71.
- [18] Wilson WR, Steingrube AV, Brown AB, Wallace Jr RJ. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic Actinomycete isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:148–52.
- [19] Yassin FA, Rainey AF, Burghardt J, Brzezinka H, Mauch M, Schaal PK. *Nocardia paucivorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:803–9.
- [20] Zolg JW, Philipp-Schulz S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of *Mycobacteria* by PCR. *J Clin Microbiol* 1994;32:2801–12. 148.
- [21] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- [22] Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175–8.