

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



DIFERENCIACION DE ACTINOMICETOS MEDIANTE  
EL ANALISIS DE ACIDOS MICOLICOS

Por

AGUSTINA DE LOS SANTOS VEGA ALONSO

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

Febrero, 1998

TM

OR82

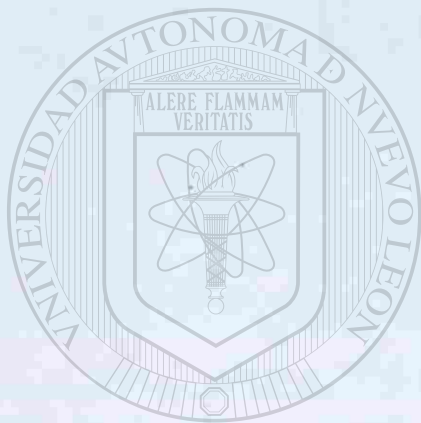
.A35

V4

C.1



1080080893



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

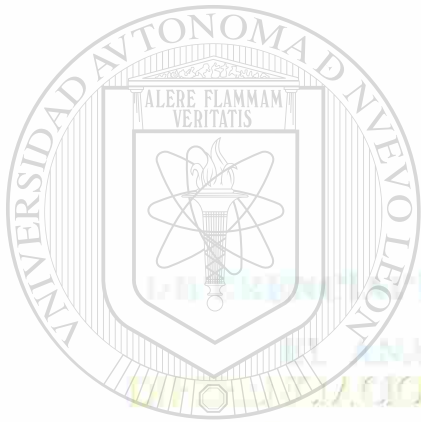
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



11141

197  
5840  
254  
251

ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE NUEVO LEÓN  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por

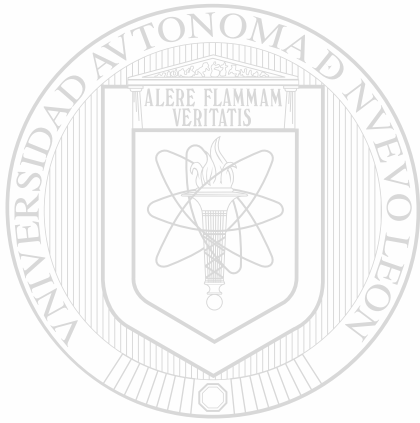
AGUSTINA DE LOS SANTOS VEGA ALONSO

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

Febrero, 1998



TM  
QR 82  
A 35  
V4



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



**DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS MEDIANTE  
EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS**

---

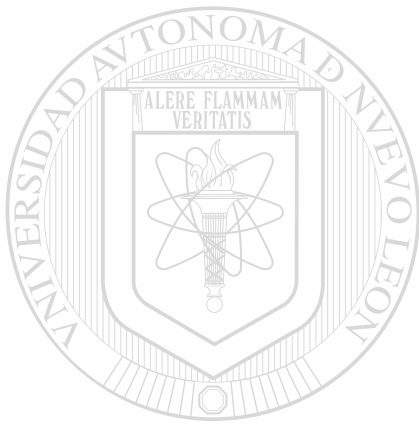
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**AGUSTINA DE LOS SANTOS VEGA ALONSO**

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

**Febrero, 1998**



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



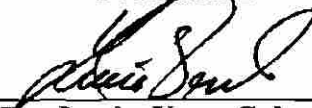


# DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS

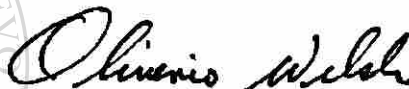
Aprobación de la Tesis:



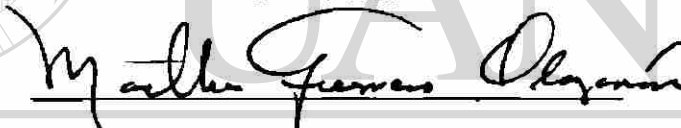
Dr. José Gerardo Velazco Castañón  
Presidente



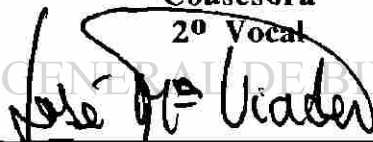
Dr. Lucio Vera Cabrera  
Secretario



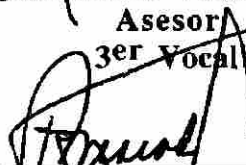
Dr. Oliverio Welsh Lozano  
1er Vocal



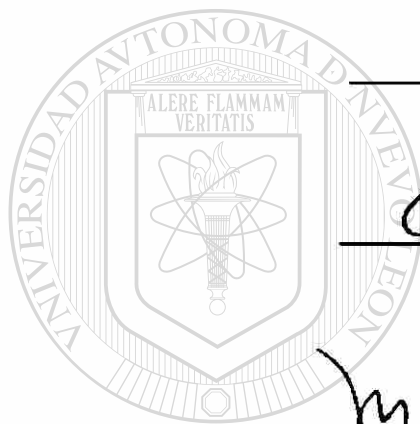
Dra. Martha Guerrero Olazarán  
Coasesora  
2º Vocal



Dr. José María Viader Salvadó  
Asesor  
3er Vocal



Dr. Roberto Mercado Longoria  
Sudirector de Estudios de Posgrado

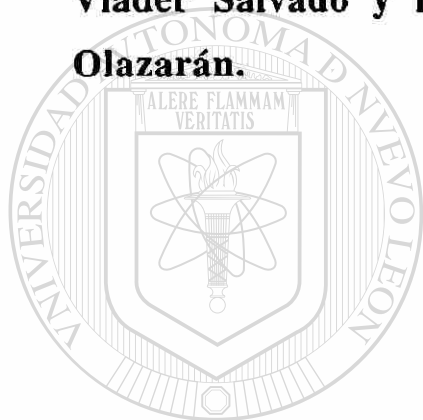


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AREA DE TRABAJO

**El presente trabajo se llevó al cabo en los Laboratorio de Microbiología de Posgrado del Departamento de Microbiología y el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Asesoría del Dr. José María Viader Salvadó y la Coasesoría de la Dra. Martha Guerrero Olazarán.**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **DEDICATORIA**

**A Dios**

**Fuerza maravillosa que dirige mi vida y la llena de luz y amor.**



**A Adrián**

**Gracias por compartir tiempo y espacio, sueños y realidades.**

# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

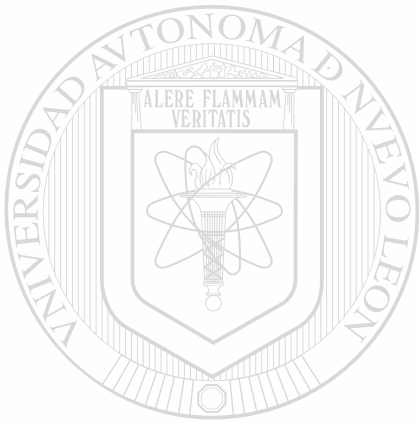




## DEDICATORIA

**A la memoria del Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla**

**Maestro cuyas enseñanzas son las huellas de su paso por este mundo.**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

**A mis Padres.**

Por su confianza incondicional.

**A Edson y a Victoria.**

Por sus risas.

**Al Dr. José María Viader Salvadó.**

Por su confianza, gran paciencia y sobretodo por sus enseñanzas.

**A la Dra. Martha Guerrero Olazarán.**

Por su disponibilidad y colaboración en la dirección de este trabajo.

**A todos los miembros de la Comisión de Tesis.**

Por sus acertados comentarios y valiosas aportaciones a este trabajo.

**Al Dr. José Gerardo Velazco Castañón.**

Por sus palabras de aliento.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.**

Por la beca otorgada.

**A Normita "nuestra" secretaria en posgrado.**

Por su enorme comprensión y sobretodo por su invaluable ayuda.

**Al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eluterio González".**

Por el material clínico proporcionado.

**Al Dr. Oliverio Welsh Lozano.**

Por su colaboración y valiosas sugerencias en la realización de este trabajo.

**A mis amigas de Micro: Caty, Conchis, Wendy y Lupita.**

Por toda su ayuda.

**A Angelitos.**

Por su disponibilidad para ayudar a los que siempre andan corriendo.

**A la Q.C.B. Esperanza Torres de Navarro, Jefe del Depto. de Química Analítica.**

Por su apoyo.

**A mis Amigos de Química Analítica.**

Por su paciencia.

**A mis Maestros.**

Por sus enseñanzas.

## RESUMEN

Agustina de los Santos Vega Alonso  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina  
Título del Estudio:

Fecha de Graduación: Febrero de 1998

Número de páginas: 68

**DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS MEDIANTE  
EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS**

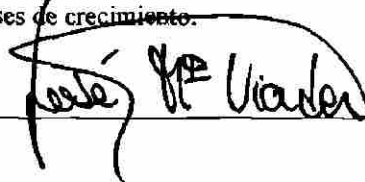
Área de Estudio:

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con  
especialidad en Microbiología Médica  
Microbiología Médica

**Propósito y Método de Estudio:** Las bacterias del orden Actinomycetales se les denomina informalmente con el término actinomiceto. En su identificación se ha considerado la composición química de la pared celular, la cual está formada por un peptidoglicano unido al arabinogalactano que forma ésteres con ácidos micólicos (ácidos grasos  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -alquil ramificados). Estos compuestos están presentes en los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*. En el presente trabajo se desarrolló una estrategia para diferenciar actinomicetos mediante el análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución y se exploró su aplicación en muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma para identificar su agente etiológico. Para ello se emplearon las cepas *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570, *Rhodococcus equi* ENCB-3117 y *Actinomadura madurae* TMC-0401. Se estandarizó el método analítico con la cepa testigo (*N. brasiliensis* HUJEG-1) utilizando un cromatógrafo de líquidos System Gold (Beckman), columna Nova-Pak C18 (Waters), detector de fluorescencia 157 (Beckman) con filtro de excitación de 305-395 nm y filtro de emisión de 430-470 nm, una elución en gradiente con metanol y cloruro de metileno a un flujo de 2.5 mL/min y el agente derivatizante de ácidos carboxílicos 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina.

**Contribuciones y Conclusiones:** En el presente trabajo se describe por primera vez el patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de *N. brasiliensis*, *N. asteroides* y *R. equi*. Se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad del tiempo de retención y altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa testigo. La alta repetibilidad y reproducibilidad en tiempo de retención obtenidas (< 1 y 3%, respectivamente) permitió utilizar la posición de los picos cromatográficos como un criterio de identificación de género. A pesar de obtener una buena repetibilidad de la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico (< 10%), en la reproducibilidad fueron evidentes dos grupos de picos cromatográficos (A, B, D, E y F < 26% y C, G, H e I > 50%), a los primeros se les designó picos diagnósticos los cuales pueden ser útiles en la identificación de la cepa testigo. Además, se estableció como límite de detección  $1.76 \times 10^5$  UFC/mL para la cepa testigo. Se propone un esquema de diferenciación de actinomicetos con base en la ausencia o presencia de picos cromatográficos correspondientes a ácidos micólicos y considerando el número de picos del patrón cromatográfico y tiempo de retención de estos, con el cual es posible diferenciar mediante el análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos los géneros *Rhodococcus* y *Nocardia* e incluso entre especies *N. brasiliensis* y *N. asteroides*. Los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras analizadas de biopsias de cuatro pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma no mostraron picos de ácidos micólicos en el intervalo del género *Nocardia*, probablemente debido a que la concentración bacteriana se encontraba por debajo del límite de detección. Sin embargo en tres de los patrones cromatográficos de los cultivos de las biopsias anteriores se pudo identificar el género del microorganismo, aunque la forma del patrón cromatográfico no coincidió con ninguna de las cepas de referencia evaluadas. Esto indica que debe ser evaluada la reproducibilidad del método analítico utilizando diversas cepas del mismo género y especie, para ver si existen pequeñas diferencias en la producción de ácidos micólicos entre diversas cepas de una misma especie y así poder diferenciar variedades dentro de una misma especie. Además, sería conveniente observar los cambios del patrón cromatográfico en diferentes medios de cultivo y fases de crecimiento.

FIRMA DEL ASESOR:





## NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
AcNMur	Ácido murámico
Ala	Alanina
ATAM	Área total de picos cromatográficos correspondientes a los ácidos micólicos
°C	Grado Celsius
C.V.	Coefficiente de variación
DAP	Ácido diaminopimélico
D. O.	Densidad óptica

---

Et al. Y colaboradores

fg Femtogramo

g Gramo

g Aceleración debida a la fuerza de gravedad

Gli Glicina

h Hora

Isoglu Isoglutámico

Lis	Lisina
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milimetro
min	Minuto
M	Molaridad (unidad de concentración)
NAcGlc	N-acetil glucosamina
nm	Nanómetro
N	Normalidad (unidad de concentración)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

n	Tamaño de la muestra
pg	Picogramo
pH	Potencial de Hidrógeno
psi	Libras por pulgada cuadrada
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias

# TABLA DE CONTENIDO

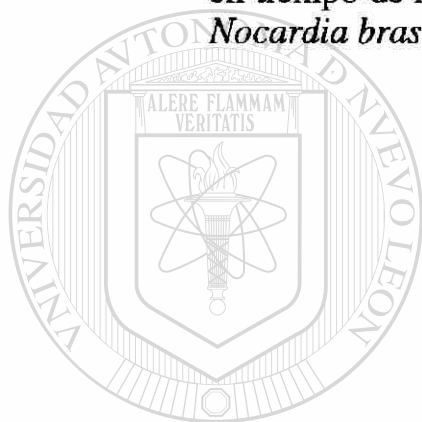
Capítulo	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Actinomicetos	1
1.1.1 Características generales	1
1.1.2 Métodos de identificación	6
1.1.3 Formas clínicas	10
1.3 Objetivos	14
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
2.1 Estrategia general	15
2.2 Preparación del material biológico	17
2.2.1 Reactivación de las cepas	17
2.2.2 Composición del medio de cultivo	18
2.2.3 Preparación del medio de cultivo	19
2.2.4 Cinéticas de crecimiento	20
2.3 Estandarización del método de análisis de ácidos micólicos	20
2.3.1 Preparación de las suspensiones bacterianas de trabajo	22
2.3.2 Análisis de ácidos micólicos de la cepa testigo <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1	23
2.3.2.1 Extracción y derivatización de ácidos micólicos	23
2.3.2.2 Análisis cromatográfico	24
2.3.3 Evaluación de la repetibilidad	25
2.3.4 Evaluación de la reproducibilidad	25
2.4 Determinación del límite de detección del método de análisis con la cepa testigo <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	26
2.5 Obtención de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros	27
2.6 Caracterización y comparación de los patrones cromatográficos	28



<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
2.7 Aplicación del método de análisis en muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma	28
2.7.1 Pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma	28
2.7.2 Preparación de las biopsias	29
2.7.3 Análisis cromatográfico de las biopsias	30
2.7.4 Análisis cromatográfico de los aislamientos clínicos	30
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
3.1 Preparación del material biológico	31
3.2 Análisis de ácidos micólicos de la cepa testigo	33
3.3 Determinación del límite de detección del método de análisis con la cepa testigo <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	36
3.4 Obtención de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros	38
3.5 Caracterización y comparación de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros	44
3.6 Análisis de muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma	46
<hr/>	
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
4.1 Preparación de material biológico	52
4.2 Análisis de ácidos micólicos de la cepa testigo	53
4.3 Determinación del límite de detección del método de análisis con la cepa testigo <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	55
4.4 Obtención y caracterización de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros	56
4.5 Análisis de muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma	57
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.	Reacciones fisiológicas de actinomicetos	8
2.	Composición del Caldo Rivas	19
3.	Reproducibilidad de los picos cromatográficos diagnósticos en tiempo de retención y altura relativa de la cepa <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1	36



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

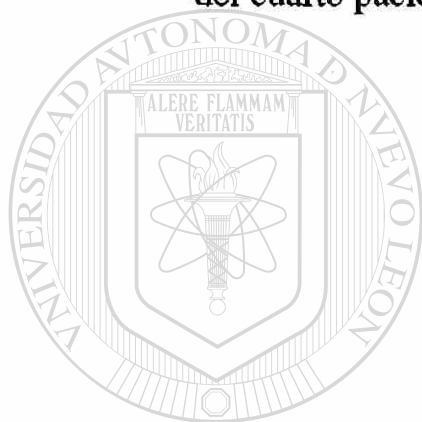
## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de la pared celular de micobacterias (Gram positivo con ácidos micólicos)	3
2. Esquema del peptidoglucano de la pared celular bacteriana	4
3. Estructuras generales de los ácidos micólicos	5
4. Esquema de la estrategia general desarrollada para la diferenciación de actinomicetos mediante el análisis de ácidos micólicos	16
5. Esquema de la estrategia empleada para la aplicación del método analítico en muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma y en los aislamientos clínicos de pacientes	17
6. Esquema de la estandarización del método para el análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos con la cepa testigo <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	21
7. Cinéticas de crecimiento de las cepas <i>Nocardia brasiliensis</i> . HUJEG-1, <i>N. asteroides</i> ENCB-7570, <i>Rhodococcus equi</i> ENCB-3117 y <i>Actinomadura madurae</i> TMC-0401	32
8. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de <i>N. brasiliensis</i> cepa HUJEG-1	33
9. Repetibilidad y Reproducibilidad del tiempo de retención de los picos del patrón cromatográfico de ácidos micólicos de la cepa <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	34

**Figura****Página**

10. Repetibilidad y Reproducibilidad de la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de ácidos micólicos de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1 35
11. Patrones cromatográficos obtenidos a diferentes diluciones de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1
12. Límite de detección del método con la cepa testigo *N. brasiliensis* HUJEG-1 38
13. Patrones cromatográficos de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de las cepas *N. brasiliensis* HUJEG-1, *N. asteroides* ENCB-7570, *R. equi* ENCB-3117 y *A. madurae* TMC-0401 40
14. Repetibilidad del tiempo de retención y altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de ácidos micólicos de *R. equi* ENCB-3117 41
15. Repetibilidad del tiempo de retención y altura relativa patrón cromatográfico de ácidos micólicos de la cepa *N. brasiliensis* ENCB-7571 42
- 
16. Repetibilidad del tiempo de retención y altura relativa patrón cromatográfico de ácidos micólicos de la cepa *N. asteroides* ENCB-7570 43
17. Esquema de diferenciación de actinomicetos mediante el análisis de ácidos micólicos 45
18. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de biopsia testigo 47
19. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra clínica y aislamiento clínico del primer paciente 48

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
20. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra clínica y aislamiento clínico del segundo paciente	49
21. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra clínica y aislamiento clínico del tercer paciente	50
22. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra clínica y aislamiento clínico del cuarto paciente	51



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Actinomicetos

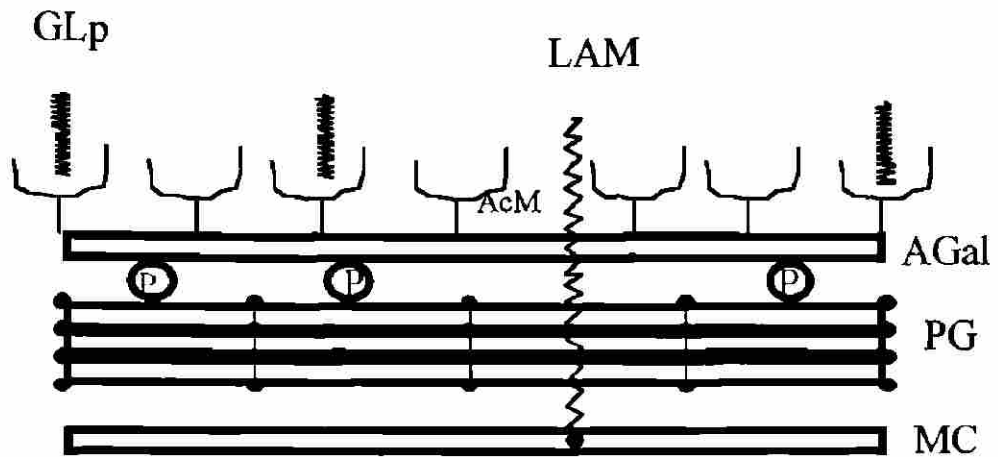
### 1.1.1 Características generales

A las bacterias pertenecientes al orden Actinomycetales se les designa con el término actinomiceto. La mayoría de los actinomicetos son gram positivos, filamentosos y parcialmente ácido alcohol resistentes. Además son bacterias que crecen en medios simples o minerales con desarrollo más lento que el de una bacteria ordinaria y son importantes causas potenciales de infecciones serias en humanos y animales (1,2). Estos microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran principalmente en suelos, plantas y vegetación en general, aunque también se pueden aislar de la piel, orofaringe y tracto gastrointestinal del hombre y animales. El hombre puede infectarse con este tipo de bacterias por inhalación o contagio directo de una herida o traumatismo abierto. Los géneros que suelen causar infecciones en el ser humano son *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Actinomadura* y *Rhodococcus* (3). El género *Mycobacterium* incluye especies causantes de enfermedades como tuberculosis, lepra y otros granulomas crónicos más o menos necrosantes, limitados o extensivos, entre ellas se considera la especie tipo a *M. tuberculosis*. El género *Nocardia* concretamente *N. asteroides* y *N. brasiliensis* son responsables de la mayor parte de las infecciones sistémicas originadas por estos

microorganismos, *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *S. somaliensis* y *A. madurae* son agentes etiológicos de micetoma. El género *Rhodococcus* se ha asociado a infecciones de heridas, abscesos, infecciones pulmonares y osteomielitis (3,4,5, 6,7,8).

Los actinomicetos poseen diversas características que son tomadas en cuenta para su identificación tales como: su fisiología donde hay formas oxidativas y fermentativas; microscópicamente presentan cambios en su morfología dependiendo de los géneros, pudiendo ser cocobacilar, difteroide o filamentosa, de modo análogo, el aspecto macroscópico de las colonias puede ser similar al de una bacteria ordinaria o presentar hifas aéreas recordando la morfología de los hongos filamentosos. En su clasificación se consideran tipo y estabilidad del micelio, variedad, número y disposición de las esporas, formación de esclerotes y esporangios; también se toma en consideración la resistencia al calor como propiedad física; y la composición química de la pared celular, principalmente su contenido de aminoácidos, ácidos micólicos, y carbohidratos (1,7).

La composición de la pared celular es una característica que se ha considerado en la identificación de los actinomicetos. La figura 1 muestra que la pared celular está formada por un peptidoglicano unido a un arabinogalactano, éste forma ésteres con ácidos grasos de alto peso molecular llamados ácido micólicos. El micolato del peptidoglicano forma el esqueleto de la pared celular (9).



GLp: Glucolípidos

LAM: Lipoarabinomano

AcM: Ácido micólico

AGal: Arabinogalactano

PG: Peptidoglicano

MC: Membrana celular

P: Proteínas

Roitt, I. Brostoff, J. 1996. Immunology. 4th. edition.

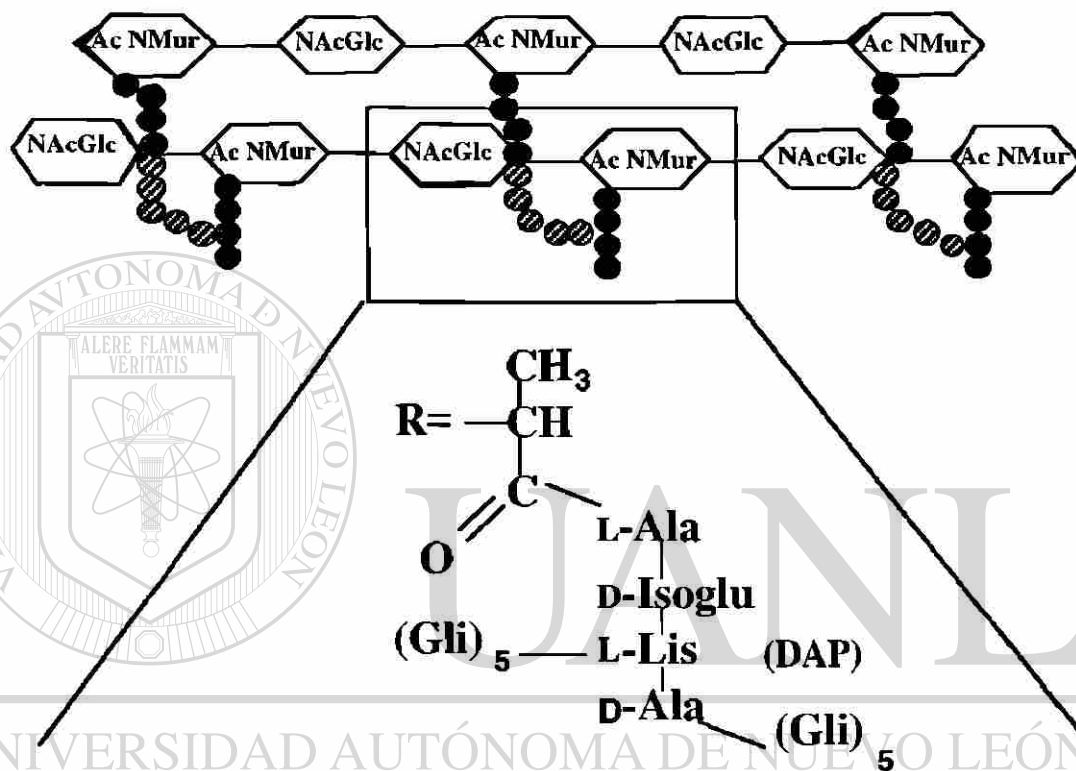
**Figura 1.** Esquema de la pared celular de micobacterias (Gram positivo con ácidos micólicos)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Otros componentes químicos considerados en la identificación de actinomicetos son los aminoácidos y azúcares. En hidrolizados de microorganismos completos la presencia o ausencia de ácido diaminopimérico (DAP) y la diferenciación de sus isómeros son de gran importancia para la identificación de estos microorganismos. En la figura 2 se muestra la posición de estos en la pared celular; tales hidrolizados también pueden contener azúcares de diagnóstico, los cuales tienen un gran valor en su identificación; para trabajo de rutina, las técnicas simplificadas de Becker et al., Lechevalier et al. y Stanek y Roberts son recomendadas



para la detección de aminoácidos y azúcares de utilidad diagnóstica (10,11).



Lehninger, A.; et al. 1993. Worth Publishers. New York. N. Y. U.S.A

**Figura 2.** Esquema del peptido glucano de la pared celular bacteriana

Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\beta$ -hidróxi- $\alpha$ -alquilramificados, se pueden encontrar libres y esterificados al arabinogalactano, como ya se vió en la figura 1. Se les considera componentes estables de la pared celular de bacterias ácido-alcohol resistentes de los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y

*Mycobacterium* y han sido utilizados para diferenciarlos ya que la longitud de las cadenas carbonadas varía con el género, (figura 3) (10). Estos les dan la capacidad de resistir la decoloración con ácidos diluidos (ácido clorhídrico al 3 % o ácido sulfúrico al 2 %) y alcohol etílico después de ser teñidas sus células con fucsina fenicada. Esta propiedad se explica por un principio de barrera lipídica: la fucsina se une y forma complejos con los residuos de ácidos micólicos presentes en la pared celular que incrementan el carácter hidrofóbico de estas bacterias e impiden la salida del colorante, la integridad de la célula es esencial para que esta característica se manifieste (10)

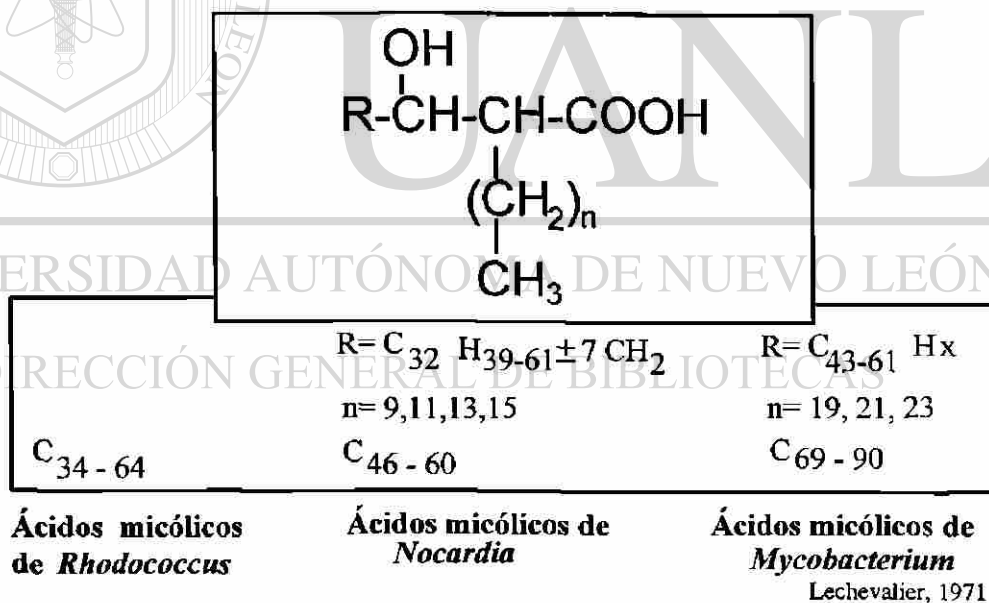


Figura 3. Estructuras generales de los ácidos micólicos

## 1.1.2 Métodos de identificación

Los siguientes métodos de identificación son utilizados para el resto de microorganismos pertenecientes a el orden Actinomycetales. Por lo tanto el género *Mycobacterium* a pesar de pertenecer a este grupo de microorganismos es estudiado por separado.

La primera característica a considerar en la identificación de actinomicetos es la morfología microscópica y sus propiedades tintoriales. Los actinomicetos aerobios son organismos Gram positivos. Tanto el género *Nocardia* como ciertas especies del género *Rhodococcus* son ácido-alcohol resistentes, característica que puede ser observada por medio de las tinciones de Zhiel Neelsen o de Kinyoun. Lo géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* tienen tendencia a fraccionarse y aparecen al microscopio con morfología cocobacilar cuando se observan con objetivo de inmersión.

*Actinomadura* y *Streptomyces* no suelen romperse y se presentan como masas filamentosas que no resisten la decoloración por el ácido-alcohol (7).

Los actinomicetos pueden crecer tanto en medio líquido como en medio sólido. No hay un medio de cultivo específico para el aislamiento de estos microorganismos. Se puede emplear el agar Sabouraud con o sin antibióticos, agar sangre, agar infusión cerebro-corazón y medio de Lowenstein-Jensen. Las especies de *Nocardia* y algunas especies de *Rhodococcus* sobreviven a menudo a los procesos de concentración y descontaminación de micobacterias y crecen en los medios de cultivo de éstas. Las placas para el aislamiento de actinomicetos se pueden incubar a

30°C. Algunas especies crecen rápidamente como *Streptomyces* y *Nocardia* el desarrollo de colonias se observa después de dos a diez días de incubación a 30°C. Otros como *Actinomadura* spp requiere hasta de tres semanas de incubación para su aislamiento (7,12, 13,14).

Con base en la fisiología de los actinomicetos se tiene una serie de pruebas bioquímicas para su diferenciación entre géneros y especies, las cuales están resumidas en la tabla 1. La descomposición de los aminoácidos tirosina y lisina, y la proteína caseína por algunas especies de actinomicetos permite su diferenciación. Para llevar al cabo estas pruebas se emplean medios sólidos, que contienen cada uno de estos compuestos. La hidrólisis se pone de manifiesto por la aparición de una zona clara alrededor de la colonia. El género *Streptomyces* hidroliza los tres compuestos, *Nocardia brasiliensis* hidroliza caseína y tirosina, mientras que *N. asteroides* no hidroliza ninguno. Los microorganismos que son resistentes a la enzima lisozima no se lisan cuando se ponen en contacto con ella. Esto le sucede a las especies que poseen la característica de la ácido-alcohol resistencia como *Nocardia* spp. y ciertos *Rhodococcus*. La producción de ureasa se prueba utilizando el medio de urea de Christensen. Hidrolizan la urea: *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*. Son negativas para esta prueba *Rhodococcus equi* y *Actinomadura* spp. La mayor parte de los actinomicetos aerobios hidrolizan la gelatina a excepción de *N. asteroides* y *N. otitidiscaviarum*. Todos los actinomicetos reducen nitratos a excepción del género *Streptomyces* y las especies *N. brasiliensis* y *R. aurantiaca*. A diferencia del resto de los actinomicetos la mayor parte de los *Rhodococcus* degradan el etilenglicol cuando se incorpora a un medio sólido como es el agar Middlebrook 7H10 (1,7,8, 12, 13).

**Tabla 1. Reacciones fisiológicas de actinomicetos**

	1	2	3	4	5	6
<b>Acido resistencia</b>	+	+	+	-	+	-
<b>Descomposición de:</b>						
<b>Caseína</b>	+	-	-	+	-	+
<b>Urea</b>	+	+	+	-	+	-
<b>Xantina</b>	-	-	+	-	-	-
<b>Resistencia a Lisozima</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Formación de ácido a partir de:</b>						
<b>Celobiosa</b>	-	-	-	+	-	-
<b>Glicerol</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Lactosa</b>	-	-	-	d	-	d
<b>Maltosa</b>	-	-	-	d	-	d
<b>Manitol</b>	+	-	d	+	-	d
<b>Xilosa</b>	-	-	-	+	-	-
<b>Reducción de nitrato</b>	+	+	+	+	-	-
<b>Hidrólisis de:</b>						
<b>Gelatina</b>	+	d	d	+	-	+
<b>Almidón</b>	d	d	d	+	d	d

d= 15-85 % de las cepas positivas 1. *Nocardia brasiliensis*, 2. *N. asteroides*, 3. *N. otitidiscaviarum*, 4. *Actinomadura madurae*, 5.

*Rhodococcus equi*, 6. *Streptomyces somaliensis*.

McNeil, M. y Brown, J. 1994. Clin. Microb. Rev. 7: 357-417.

Los métodos bioquímicos que se han utilizado en la identificación de estos microorganismos considerando la composición de la pared celular son: cromatografía en papel para el análisis de aminoácidos, azúcares de utilidad diagnóstica y ácidos micólicos, cromatografía en capa fina en el análisis de componentes de pared celular, cromatografía de gases con espectrometría de masas para el análisis de ácidos grasos de pared celular y cromatografía de líquidos de alta resolución en el análisis de ácidos micólicos (13). En los últimos años se ha dado un gran énfasis a este último método analítico; en 1986 se desarrolló un método para el análisis de micolatos de *p*-bromofenancilo los cuales son detectados por su patrón de absorbancia en ultravioleta (254 nm), logrando diferenciar los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de los géneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium* (15). Posteriormente esta metodología permitió la diferenciación de especies de *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium* (16, 17). Aplicando la metodología desarrollada en 1986 fue posible el establecimiento de un esquema de diferenciación de los ácidos micólicos de diversas especies de micobacterias mediante la comparación del tiempo de retención relativo de los picos y la relación de alturas de éstos, permitiendo la obtención de patrones representativos de micolatos de *p*-bromofenancilo para cada especie (18, 19). En 1995 utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución en la determinación de derivados fluorescentes de ácidos micólicos (micolatos de 6,7-dimetoxicumarina) se logró identificar especies del género *Mycobacterium* directamente en muestras clínicas sin someterlas a cultivo, gracias a que la fluorescencia aumentó considerablemente la sensibilidad del análisis (20,21). Recientemente se ha descrito una relación exponencial entre el área total de los picos

cromatográficos identificados como ácidos micólicos (ATAM) en un cultivo de *M. tuberculosis* y las UFC/mL obtenidas mediante el método tradicional de cuenta en placa después de incubar un mínimo de tres semanas en medio Middlebrook 7H10 (22).

### 1.1.3 Formas clínicas

Los actinomicetos son muy importantes desde el punto de vista médico debido a que son los agentes causantes de tuberculosis, nocardiosis, micetoma, estreptotricosis, neumonías alérgicas, paratuberculosis y actinomycosis.

La tuberculosis es una infección bacteriana crónica causada por *M. tuberculosis* y se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos infectados y hipersensibilidad mediada por células; el sitio usual de la enfermedad son los pulmones, pero otros órganos pueden estar involucrados; en la ausencia de un tratamiento efectivo para la enfermedad activa, es común un curso crónico, y finalmente sobreviene la muerte.(5,6)

La nocardiosis pulmonar o sistémica es una enfermedad aguda o crónica, generalmente supurativa, causada por la inhalación o el contacto traumático con actinomicetos aerobios, se asocia a pacientes con inmunodepresión en quienes el agente se desarrolla en forma de pseudofilamentos; la localización inicial puede ser pulmonar o cutánea (5,12, 23,24,25)

La enfermedad respiratoria alérgica es una reacción de hipersensibilidad frente a antígenos de los actinomicetos, como consecuencia de la exposición repetida a éstos. (7)

La actinomicosis es causada por bacterias que son parte de la flora oral normal; en esta infección crónica, supurativa y granulomatosa, se observan granos amarillos. Después de que los comensales orales han invadido la cara, el cuello, los pulmones y/o la región del íleon, la infección se diseminan a estructuras cercanas, sin restricción por parte de las barreras de los tejidos (3,5,26).

De entre esta variedad de procesos patológicos en los que intervienen los actinomicetos como agentes etiológicos, el de mayor interés para el presente trabajo es el micetoma.

El micetoma es una infección crónica de la piel y de los tejidos subyacentes con tendencia a afectar a los huesos. Se caracteriza por un aumento de volumen, es relativamente indoloro y produce fístulas a través de las cuales se eliminan pus y granos, constituidos por filamentos.

Los agentes causales son de origen exógeno y pueden ser hongos (eumicetoma) o actinomicetos (actinomicetoma).

La infección se produce por la penetración del agente etiológico a través de heridas en la piel, los agentes causales se aislan con facilidad a partir de tierras de cultivo. Por esta característica el padecimiento es más frecuente en jóvenes adultos que desempeñan actividades agrícolas en quienes puede causar invalidez y aún la muerte en caso de no ser tratados adecuadamente (12).

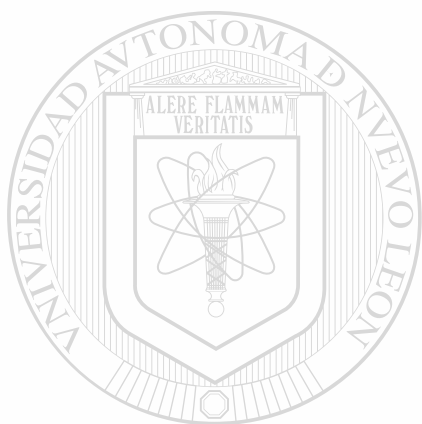


El estado nutricional, susceptibilidad a la infección, respuesta inmune y tratamiento inicial, determinan que se resuelva la infección o que se instale la entidad con el cuadro clínico característico (8). La infección puede localizarse en cualquier segmento corporal, pero se presenta con mayor frecuencia en los miembros inferiores debido al gran número de traumatismos que sufren los campesinos en los pies durante el trabajo en el campo. Se han observado micetomas en otros sitios como región torácica, miembros superiores, cuello, abdomen y la cabeza. Su evolución es a menudo lenta pero en algunos, su desarrollo es relativamente rápido y en el curso de uno a dos años, pueden afectar huesos o diseminarse a órganos vecinos, la afectación a pulmón y a médula espinal es vista en las formas torácicas, también puede existir diseminación por vía linfática a ganglios regionales y en ocasiones muy raras por vía hematogena. En las formas cefálicas el peligro es la diseminación al cerebro, lo que generalmente trae consecuencias fatales. En ocasiones los micetomas son muy pequeños y en otras pueden adquirir formas atípicas con formación de tejidos de granulación exuberante que le da un aspecto neoplásico a la lesión (8).

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los casos de micetoma se presentan en todo el mundo, sin embargo predominan en los países situados en el cinturón intertropical. Son más frecuentes los casos de micetoma en regiones templadas de América, Europa, Asia y África (entre los paralelos 14 y 32). Los países más afectados son India, Sudán, Senegal, Somalia, México, Venezuela, Colombia y Brasil. En México se han presentado casos en los estados de Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (8, 27). Los microorganismos reportados que causan actinomicetomas incluyen a *N. brasiliensis*, *Actinomadura*

*madurae*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, y menos comúnmente *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *Nocardiosis dassonvillei* y *N. transvalensis*. El agente etiológico más frecuente en México es *Nocardia brasiliensis* con un 86 %, seguido por *Actinomadura madurae*, *Streptomyces somaliensis*, *A. pelletieri*, *N. asteroides* y *N. otitidiscaviarum*. (8, 27)



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 1.2 Objetivos

### Objetivo general

Diferenciar especies de actinomicetos mediante el análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de muestras de cultivos y explorar la aplicación de este análisis en muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma para identificar el agente etiológico.

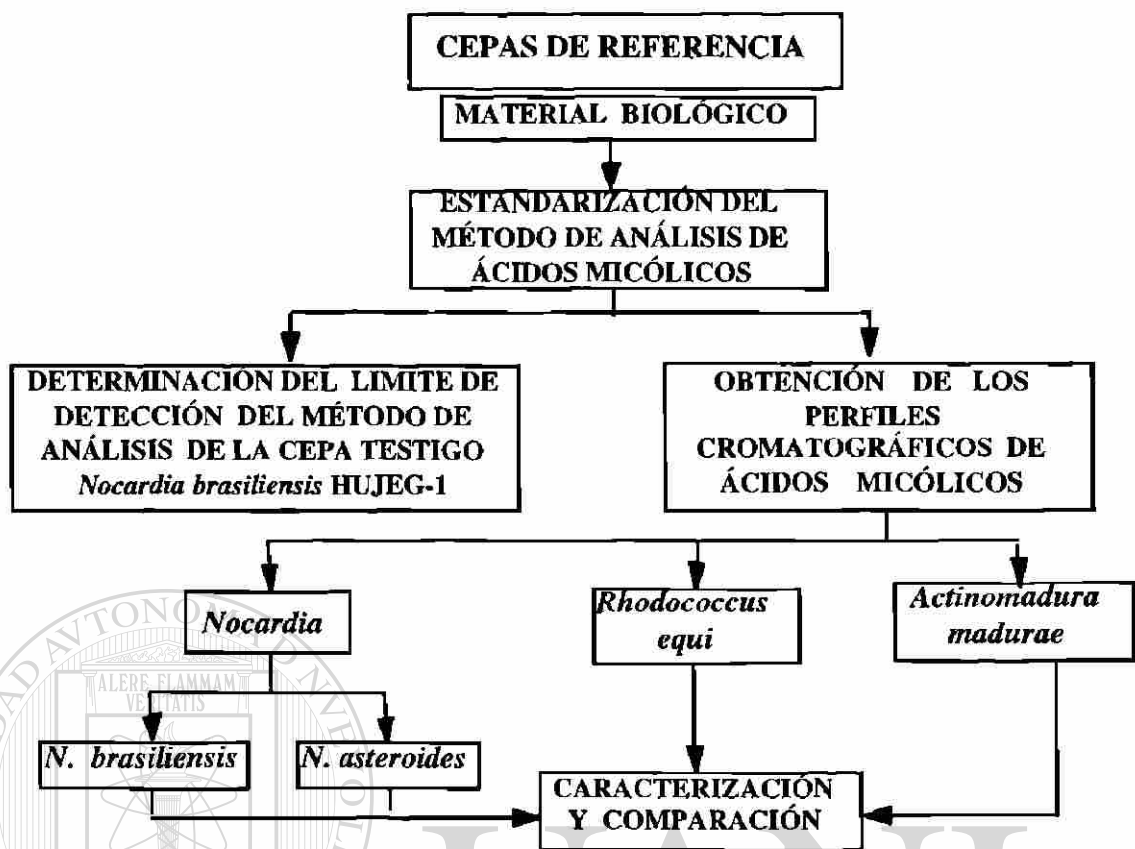
### Objetivos específicos

1. Estandarizar el método de análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución con una cepa testigo (*Nocardia brasiliensis* HUJEG-1).
2. Establecer el límite de detección del método de análisis con una cepa testigo (*N. brasiliensis* HUJEG-1).
3. Determinar el patrón cromatográfico de ácidos micólicos de las especies de *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *Rhodococcus equi* y *Actinomadura madurae*.
4. Caracterizar y comparar los patrones cromatográficos de ácidos micólicos obtenidos.
5. Aplicar el método de análisis de ácidos micólicos en muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Estrategia General

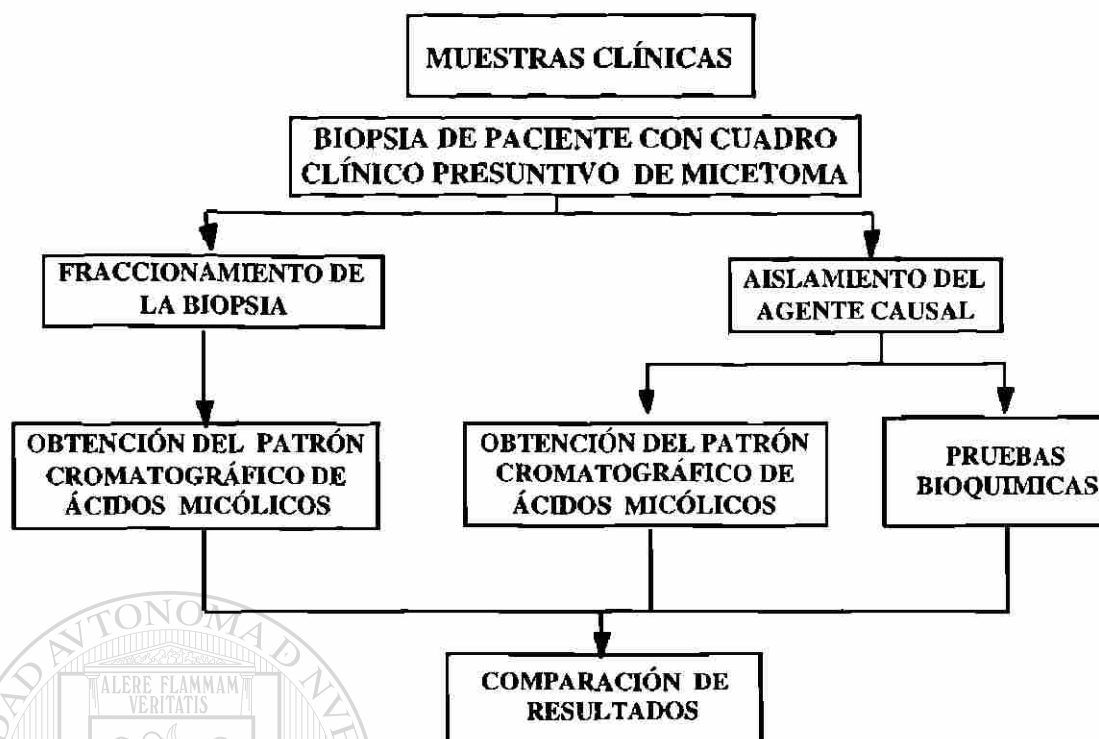
El análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución, permite comparar las diferencias en la pared celular de los actinomicetos, para lo cual se siguió la estrategia general que se muestra en la figura 4. Se emplearon las cepas *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570, *Rhodococcus equi* ENCB-3117 y *Actinomadura madurae* TMC-0401, se realizaron cinéticas de crecimiento donde se estableció el tiempo para llegar a la fase logarítmica tardía de cada microorganismo. Se estandarizó el método analítico con la cepa testigo *N. brasiliensis* HUJEG-1, se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad del ATAM, y del tiempo de retención y altura relativa de los mismos. Se determinó el límite de detección del método con la cepa testigo (*N. brasiliensis* HUJEG-1). Se obtuvieron los patrones cromatográficos para las cepas *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570, *R. equi* ENCB-3117 y *A. madurae* TMC-0401. Se caracterizaron mediante el tiempo de retención y altura relativa de los picos correspondientes a ácidos micólicos, y se compararon entre sí.



**Figura 4.** Esquema de la estrategia general desarrollada para la diferenciación de actinomicetos mediante el análisis de ácidos micólicos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para la aplicación del método analítico a muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma, se empleó la estrategia que se muestra en la figura 5. Se determinó el patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de biopsias de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma y de los aislamientos clínicos de estos pacientes. Estos patrones fueron correlacionados con las pruebas bioquímicas tradicionales de identificación de actinomicetos.



**Figura 5.** Esquema de la estrategia empleada para la aplicación del método analítico en muestra clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma y en los aislamientos clínicos de pacientes

## 2.2 Preparación del material biológico

### 2.2.1 Recuperación de las cepas

Las cepas de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570, *Rhodococcus equi* ENCB-3117 y *Actinomadura madurae* TMC-0401 se recuperaron por incubación en agar infusión cerebro-corazón (BHI) enriquecido con sangre durante 7 días a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente se propagaron en tubos cónicos de 50 mL con

tapón de rosca con 10 mL de caldo Rivas (tabla 2), se incubaron a  $37 \pm 2$  °C durante 48 horas con agitación a 200 rpm en agitador mecánico (Lab-Line Orbit Shaker No 3590, Lab-Line Instruments, Inc.) (28). Los tubos se centrifugaron en una centrífuga Beckman a 3000 rpm durante 10 min, la masa celular se lavó dos veces con NaCl al 0.85 % (solución salina). Se obtuvo la masa celular la cual se incubó de nuevo en las condiciones anteriores. Con la biomasa obtenida se preparó una suspensión homogenizada con perlas de vidrio y en vortex durante 15 min en 5 mL de solución salina y se guardó en refrigeración (4°C), hasta su empleo.

### 2.2.2 Composición del medio de cultivo

Tradicionalmente el medio de cultivo recomendado en la literatura para el cultivo de actinomicetos ha sido el agar o caldo infusión cerebro-corazón, pero debido a su alto costo, se utilizó el medio Rivas el cual como se muestra en la tabla 2 contiene glucosa, hidrolizado de peptona y de colágeno, extracto de levadura, NaCl y CaCO<sub>3</sub>, con un rendimiento de biomasa 5 veces mayor y menos de 30 veces su costo (28, 29).

**Tabla 2. Composición del caldo Rivas**

<b>COMPONENTE</b>	<b>% (p/v)</b>
Glucosa	4.0
Extracto de levadura	0.5
Hidrolizado de peptonas de colágeno	4.0
NaCl	0.5
CaCO <sub>3</sub>	0.01
pH	7.0

Rivas-Morales C. Comunicación personal

### 2.2.3 Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo de acuerdo a lo recomendado por C. Rivas (16). Se suspendieron 8.7 g del medio en polvo por cada 100 mL de caldo a preparar, se ajustó el pH a 7.0, se tomaron alícuotas de 10 mL en tubos de 50 mL y de 3.5 mL en tubos de 15 x 150 mm ambos con tapón de rosca. Se esterilizó en autoclave a 15 libras/pulgada<sup>2</sup> (psi) y 121°C durante 5 minutos. Se guardó a temperatura ambiente durante 24 horas para verificar su esterilidad y posteriormente se refrigeró a 4°C.

Para la preparación de placas con medio Rivas enriquecido con sangre se suspendieron 8.7 g del medio en polvo, se adicionaron 1.4 g de agar bacteriológico por cada 100 mL de medio, se esterilizó en autoclave a 15 psi y 121°C durante 5 min y se enfrió a 45°C. Se añadieron



asépticamente 5 mL de sangre y se vaciaron a cajas Petri 15 mL del medio. Se verificó su esterilidad al mantenerlas a temperatura ambiente durante 24 h y se guardaron en refrigeración a 4°C.

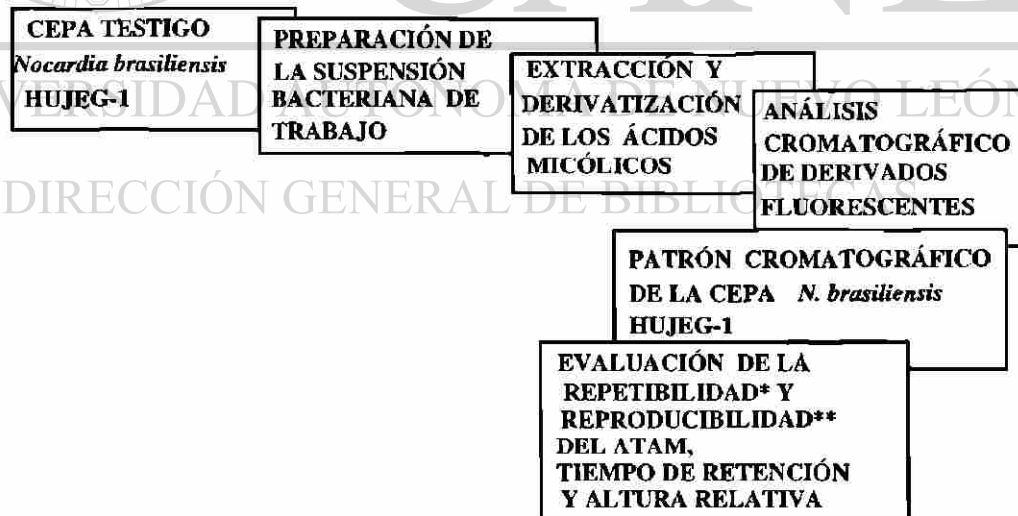
#### 2.2.4 Cinéticas de crecimiento

Se realizaron cinéticas de crecimiento para cada microorganismo. Se tomó un inóculo de 50 µL de la biomasa obtenida como se describió anteriormente (2.2.1) para cada tubo de una serie de 20, los cuales contenían 3.5 mL de caldo Rivas. Se incubaron a  $37 \pm 2$  °C con agitación a 200 rpm en un agitador mecánico Lab-Line Orbit Shaker No 3590, (Lab-Line Ins., Inc). Se realizaron mediciones de la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Turner modelo 390 con filtro de 420 - 890 nm cada 12 h las primeras 48 h, y posteriormente cada 4 h hasta tener el microorganismo en fase logarítmica tardía la cual se determinó realizando la curva de crecimiento considerando la densidad óptica contra el tiempo.®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 2.3 Estandarización del método de análisis de ácidos micólicos

Para el análisis de ácidos micólicos se empleó una modificación del método estandarizado para la identificación de *Mycobacterium* por CLAR (30) con el método de derivatización descrito por Jost et al (20). La figura 6 muestra la estrategia de trabajo que se siguió para la estandarización del método de análisis de ácidos micólicos. Se preparó una suspensión bacteriana de trabajo de la cepa testigo *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, de la cual se partió para la extracción y derivatización de los ácidos micólicos y posteriormente se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad del ATAM, tiempo de retención y altura relativa del patrón de los picos cromatográficos de la cepa testigo.



\*Se realizaron 6 análisis en el mismo día, del mismo cultivo

\*\*Se realizaron 21 análisis en diferentes días, de diferentes cultivos

**Figura 6.** Esquema de la estandarización del método para el análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos con la cepa testigo *N. brasiliensis* HUJEG-1

### 2.3.1 Preparación de la suspensión bacteriana de trabajo

De la cepa testigo se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L de inóculo, se inocularon en tubos con caldo Rivas preparados como se describió anteriormente (2.2.2) y se incubaron a  $37 \pm 2$  °C con agitación a 200 rpm en un agitador mecánico Lab-Line Orbit Shaker No 3590, (Lab-Line Ins., Inc). durante el tiempo establecido en la cinética de crecimiento de cada microorganismo. Se obtuvo la biomasa de estos tubos, se lavó con solución salina para la eliminación del medio de cultivo, se suspendió en 10 mL de solución salina, se disgregó con perlas de vidrio y vortex durante 15 minutos, se homogenizó y se dejó sedimentar. Se separó el sobrenadante, se transfirió a un tubo estéril de 13 x 100 mm y se ajustó la absorbancia a de la suspensión a la correspondiente al tubo 1 del Nefelómetro de McFarland (D. O.= 0.165, 540 nm) con solución salina.

### 2.3.2 Análisis de ácidos micólicos de la cepa testigo

A partir de la suspensión bacteriana de trabajo de la cepa testigo *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 se realizó el análisis de ácidos micólicos por CLAR.

#### 2.3.2.1 Extracción y derivatización de ácidos micólicos

Se tomaron 6 alícuotas de 1 mL de la suspensión bacteriana de trabajo, a cada alícuota se añadieron 1 mL de KOH al 50 % en H<sub>2</sub>O y se mezcló por inversión suave. Los tubos se calentaron 1 hora en autoclave a 121°C y se enfriaron a temperatura ambiente. A cada tubo se le adicionó 1.7 mL de HCl 6 N para acidificar, se añadió 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> grado HPLC y se agitó el tubo vigorosamente durante 1 min. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo 2 veces más con 0.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en cada extracción. El extracto orgánico se llevó a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> y calentando a 60°C en un bloque de calentamiento (Thermolyne, Type 17600).

Para la derivatización de los ácidos micólicos, se siguió el procedimiento descrito por K. Jost et al. (20). Al extracto seco de ácidos micólicos se añadieron 100 µL de KHCO<sub>3</sub> 0.2 M en CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (1:1), se calentó a 60°C en bloque de calentamiento bajo corriente de N<sub>2</sub> hasta sequedad. Posteriormente se añadieron 100 µL de una solución de 1.25 mg/mL de 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina y 0.15 mg/mL de éter

corona 18-crown-6 en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se cerró herméticamente el tubo. Se calentó a  $90^\circ\text{C}$  durante 20 min, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 1 mL de una mezcla de  $\text{HCl}$  12N- $\text{CH}_3\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (1:2:1) y 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El tubo se mezcló vigorosamente y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo 2 veces más con 0.5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los extractos orgánicos se recolectaron en un tubo de microcentrífuga graduados de 2 mL (Cel Associates, Inc). El extracto orgánico se evaporó a sequedad calentando a  $60^\circ\text{C}$  en un bloque de calentamiento bajo corriente de  $\text{N}_2$ .

### 2.3.2.2 Análisis cromatográfico

El residuo seco de derivados fluorescentes de ácidos micólicos se enfrió a temperatura ambiente y se disolvió en 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  frío ( $4^\circ\text{C}$ ) grado HPLC, se centrifugó a 8,160  $\times g$  (10 000 rpm) en una microcentrífuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Inc) durante 1 min, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se inyectaron inmediatamente en un cromatógrafo de líquidos System<sup>®</sup> Gold (Beckman Instruments, Inc., San Ramon CA) provisto de un bucle de inyección de 20  $\mu\text{L}$ . Se empleó una columna de fase reversa Novapak- $\text{C}_{18}$  de 150 x 4.6 mm (Waters), una columna de guardia Novapak- $\text{C}_{18}$  de 3.9 x 20 mm (Waters) y un detector de fluorescencia 157 (Beckman) con filtro de excitación de 305-395 nm y filtro de emisión de 430-470 nm. Se utilizó un sistema de elución de gradiente con un eluyente A ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y un eluyente B ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ambos grado HPLC: iniciando con 2-20 % de B durante 1 min, posteriormente con 20-65 % de B en 10 min, y 65 % de B durante 0.5 min, y por último con 65-2 % de B en 4 min, a un flujo de 2.5

mL/min. Las condiciones iniciales de elución fueron mantenidas por 5 min antes de una nueva inyección. Se consideraron los picos cuyos tiempos de retención fueron mayores al pico más prominente detectado inmediato al tiempo muerto (min) como correspondientes a los ácidos micólicos.

### 2.3.3 Evaluación de la repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad del ATAM se realizaron 6 análisis a partir del mismo cultivo de la cepa testigo, se obtuvo la media, desviación estándar y el C.V. Para evaluar la repetibilidad del tiempo de retención y altura relativa del patrón de los picos cromatográficos de ácidos micólicos se realizaron 6 análisis el mismo día a partir del mismo cultivo de la cepa testigo, se obtuvo la media, desviación estándar y C.V. de cada pico. Se calculó la altura relativa mediante la relación de la altura de cada pico correspondiente a ácido micólico y la suma total de las alturas de los picos considerados anteriormente (2.3.2.2).

### 2.3.4 Evaluación de la reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad del tiempo de retención y altura relativa del patrón de los picos cromatográficos de ácidos micólicos se realizaron 21 análisis en diferentes días y partiendo de diferentes cultivos de la cepa testigo. Se calculó la desviación estándar conjunta como la raíz cuadrada

de la suma de la suma de cuadrados en los grupos y entre grupos sobre la suma de grados de libertad en los grupos y entre grupos. Se definió grupo al conjunto de análisis efectuados el mismo día y del mismo inóculo. Se calculó el C.V. como la desviación estándar conjunta sobre la media conjunta (31).

#### **2.4 Determinación del límite de detección del método de análisis con la cepa testigo *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1**

Para determinar el límite de detección del método de análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos, se evaluó mediante cuenta en placa la concentración bacteriana (UFC/mL) de la suspensión de trabajo de la cepa testigo, para lo cual se prepararon una serie de seis diluciones a partir de  $2.6 \times 10^7$  hasta  $2.6 \times 10^2$  UFC/mL y se tomaron alícuotas de 0.01 mL para las tres primeras diluciones y 0.1 mL para el resto. Se sembraron por extensión con asa de vidrio en "L" en agar Rivas enriquecido con sangre y se incubaron a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días, posteriormente se realizó el conteo de UFC. De cada una de las suspensiones bacterianas preparadas a partir de  $2.6 \times 10^7$  hasta  $2.6 \times 10^2$  UFC/mL, se tomó 1 mL para el análisis de ácidos micólicos. Se calculó el ATAM para las suspensiones de concentración bacteriana en las cuales se detectó un patrón de ácidos micólicos. Se graficaron los valores de ATAM obtenidos de diferentes diluciones contra las UFC/mL y mediante un análisis de regresión lineal se calculó el punto de corte con el eje de las ordenadas, el cual fue considerado como el límite de detección del método analítico.

## 2.5 Obtención de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros

De las suspensiones de trabajo preparadas anteriormente (2.3.1) de las cepas *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570, *Rhodococcus equi* ENCB-3117 y *Actinomadura madurae*, se tomaron tres alícuotas de 1 mL de cada cepa para realizar el análisis cromatográfico se empleó el método descrito anteriormente (2.3.2). Se identificaron los picos considerados anteriormente (2.3.2.2) como correspondientes a los ácidos micólicos de las cepas estudiadas, siendo el control negativo la cepa *A. madurae*.

Para evaluar la repetibilidad del ATAM se realizaron 3 análisis a partir del mismo cultivo de las cepas *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570 y *Rhodococcus equi* ENCB-3117, se obtuvo la media, desviación estándar y el C.V.. Para evaluar la repetibilidad del tiempo de retención y altura relativa del patrón de los picos cromatográficos de ácidos micólicos se realizaron 3 análisis el mismo día a partir del mismo cultivo de cada una de las cepas; se obtuvo la media, desviación estándar y C.V. de cada pico.



## **2.6 Caracterización y comparación de los patrones cromatográficos**

Todos los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las cepas estudiadas se caracterizaron mediante el número de picos considerados correspondientes a los ácidos micólicos (2.3.2.2) y se realizó una comparación de los mismos mediante una superposición visual.

## **2.7 Aplicación del método de análisis en muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma**

### **2.7.1 Pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma**

Se incluyeron en este estudio cuatro pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José Eluterio González" con un cuadro clínico presuntivo de micetoma. El primer paciente fue del sexo femenino de 46 años de edad con una lesión en el muslo derecho cuyo estudio histológico indicó un proceso granulomatoso crónico compatible con micetoma, bajo tratamiento con antimicrobianos (Amikacina y Trimetoprim-sulfametoxazol). El segundo paciente fue del sexo masculino de 18 años de edad con lesión en la cara posterior del torax, bajo tratamiento con antimicrobianos (Amikacina y Trimetoprim-sulfametoxazol), del cual se aisló *Nocardia brasiliensis*. El tercer

paciente de 44 años de edad presentó lesión en el brazo derecho con diagnóstico presuntivo de micetoma contra esporotricosis, sin tratamiento previo con antimicrobianos. El cuarto paciente fue del sexo femenino de 58 años de edad con una lesión en la axila con diagnóstico presuntivo de micetoma nocardioso, sin tratamiento previo con antimicrobianos.

### 2.7.2 Preparación de las biopsias

Se analizó una biopsia de una área aproximada de 5 x 8 mm de piel sana como testigo negativo del patrón de ácidos micólicos de biopsias, y una biopsia por paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma del mismo tamaño que la testigo. La biopsia testigo fue fraccionada con bisturí posteriormente con perlas de vidrio y en vortex por 30 min, a la muestra ya fraccionada en pequeñas partículas se le añadió directamente el KOH.

Las biopsias de los pacientes fueron primero fraccionadas con bisturí, posteriormente con perlas de vidrio y en vortex por 30 min. Las muestra del primer y segundo paciente se suspendieron en 10 mL de solución salina, se homogenizaron y se tomaron 3 alícuotas de 1 mL para el análisis cromatográfico. La muestra del tercer y cuarto paciente se suspendieron en 5 mL de solución salina, se homogenizaron y se tomaron 3 alícuotas de 1 mL para el análisis cromatográfico. A toda la muestra de la biopsia de piel sana y a las diluciones anteriores de las muestras de los pacientes, se adicionó 1 mL de KOH al 50 % en H<sub>2</sub>O y se procedió según el método descrito anteriormente (2.3.2.1).

### 2.7.3 Análisis cromatográfico de las biopsias

El residuo seco de los derivados fluorescentes se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  frío ( $4^\circ\text{C}$ ) y se siguió el método descrito anteriormente (2.3.2.2).

Para estar por debajo del límite de saturación del detector de fluorescencia antes de un segundo análisis cromatográfico, la muestra del primer paciente se diluyó 1:100, la del segundo paciente se diluyó 1:10, la del tercer paciente se diluyó 1:500 y la del cuarto 1:10, todas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Posteriormente se siguió el método descrito anteriormente (2.3.2.2).

### 2.7.4 Análisis cromatográfico de los aislamientos clínicos

Para la identificación del agente causal se realizaron cultivos microbiológicos (Laboratorio de Dermatología) y pruebas bioquímicas tradicionales de las biopsias de los pacientes. De los aislamientos clínicos se tomó masa celular, la cual fue lavada 2 veces con solución salina, se añadieron directamente 2 mL de KOH al 50% en  $\text{H}_2\text{O}$ , se tomaron alícuotas de 1 mL para realizar el análisis cromatográfico de ácidos micólicos mediante el método descrito anteriormente (2.3.1).

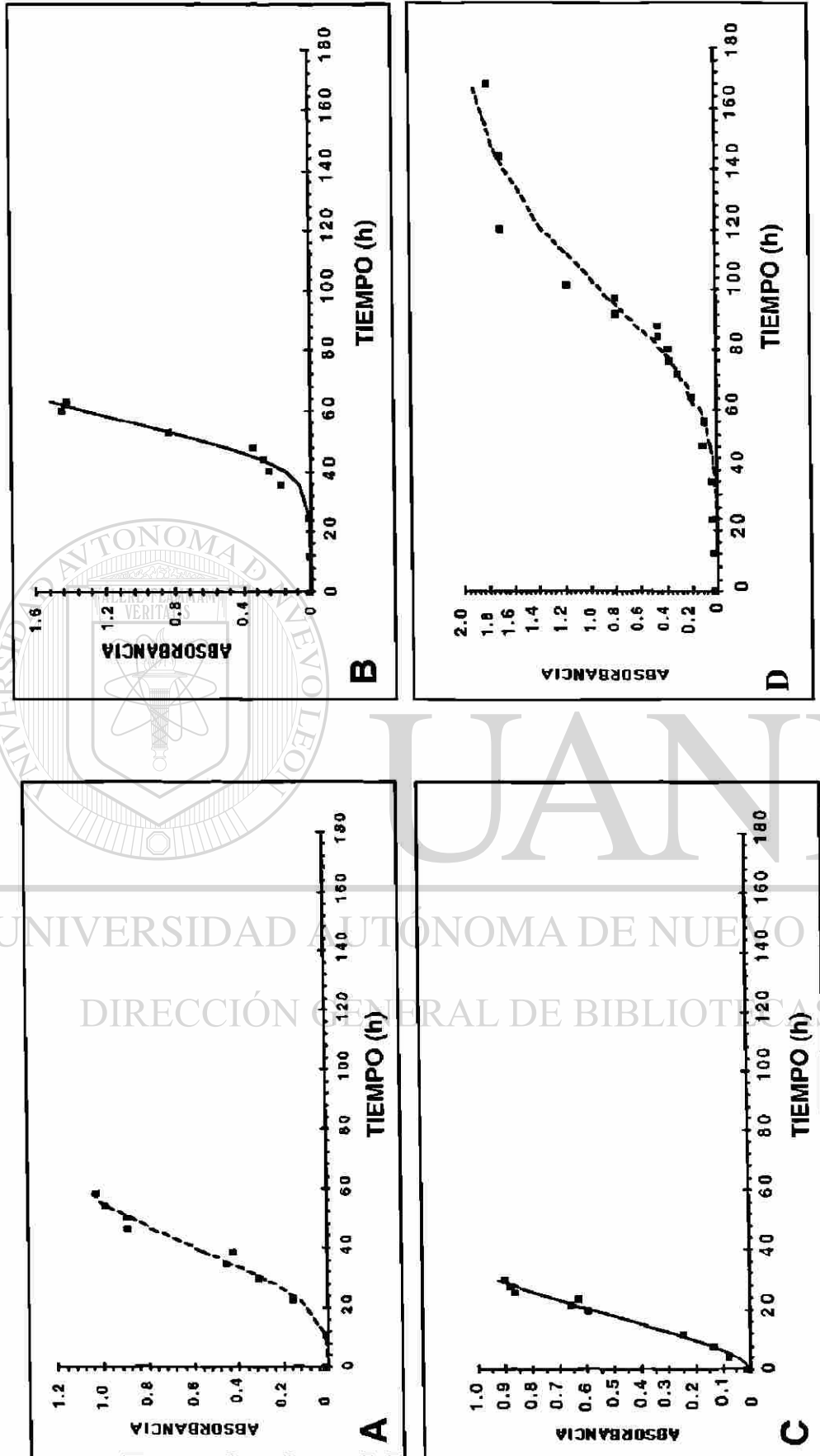
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Preparación del material biológico

Las cepas se recuperaron en agar infusión cerebro-corazón garantizando el buen estado del microorganismo. La biomasa de las cepas empleadas fue guardada en refrigeración (4°C) esto permitió contar con un suministro de los microorganismos disponibles para los análisis realizados.

Los cultivos de los actinomicetos empleados en este estudio en el caldo Rivas presentaron las características de desarrollo reportadas previamente.

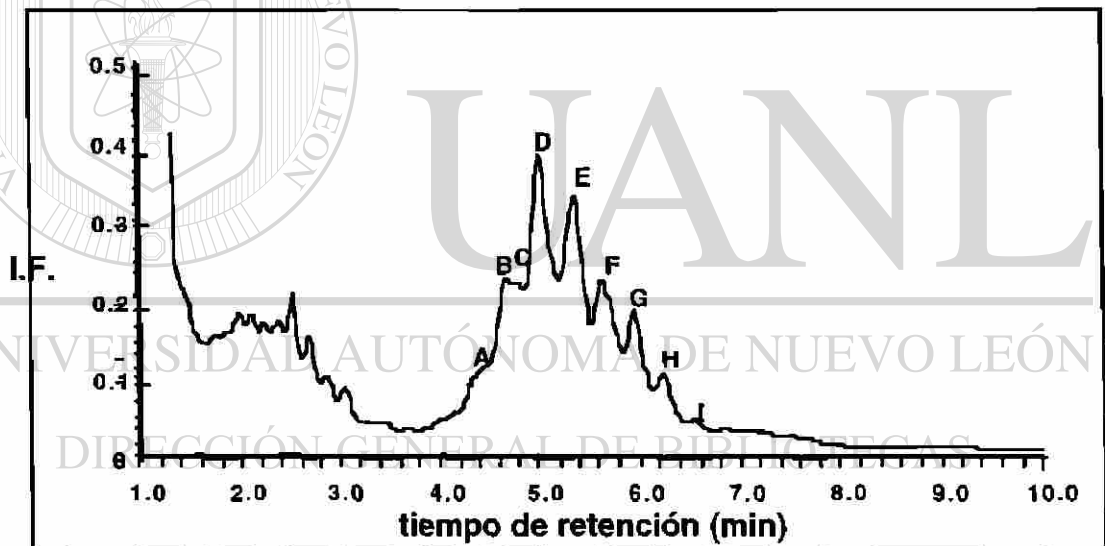
En la figura 7 se muestran las cinéticas de crecimiento de las cepas *N. brasiliensis* HUJEG-1, *N. asteroides* ENCB-7570, *Rhodococcus equi* ENCB-3117, *Actinomadura madurae* TMC 0401. La cepa *N. brasiliensis* (figura 7A) requirió 50 h en llegar a la fase de crecimiento logarítmica tardía. Mientras que la cepa de *N. asteroides* requirió de 55 h para llegar a esta fase de crecimiento (figura 7B). La cepa de *R. equi* es un actinomiceto de rápido crecimiento ya que se observó que sólo requirió 26 h para alcanzar la fase logarítmica tardía (figura 7C). Por lo contrario la cepa de *A. madurae* es un actinomicetos de lento crecimiento (figura 7D) ya que tardó 120 h para llegar a la fase logarítmica tardía.



**Figura 7.** Representación gráfica de las cinéticas de crecimiento de las cepas A) *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, B) *Nocardia asteroides* ENCB-7570, C) *Actinomadura madurae* TMC-0401, D) *Rhodococcus equi* ENCB-3117 D)

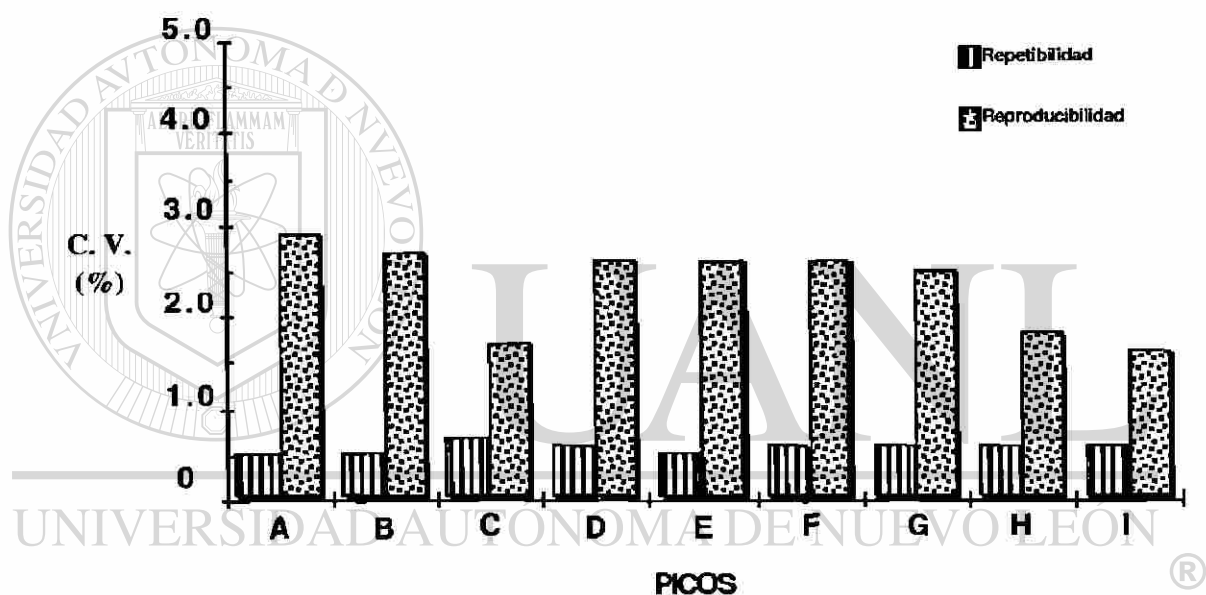
### 3.2 Análisis de ácidos micólicos de la cepa testigo

El método analítico fue estandarizado con la cepa testigo *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. En la figura 8 se muestra el patrón cromatográfico de los derivados fluorescentes de ácidos micólicos de esta cepa, los picos comprendidos entre 4.4 y 6.5 min corresponden a sus ácidos micólicos. Se les asignó una letra de acuerdo al orden de elución. Se obtuvo una repetibilidad del ATAM del 4.0 %.



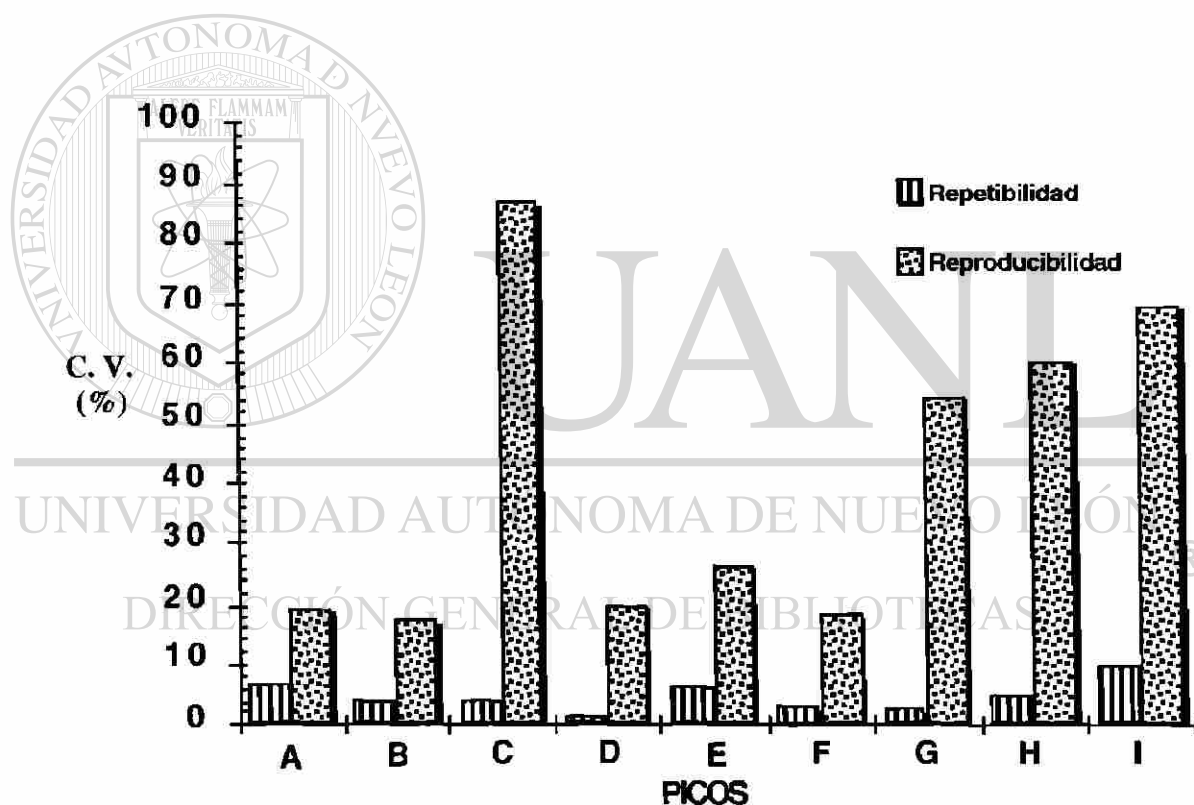
**Figura 8.** Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1  
ATAM  $455 \pm 19$  C. V. 4.0%  
n= 6 análisis en el mismo día del mismo cultivo

En la figura 9 se muestra la repetibilidad y reproducibilidad del tiempo de retención de los picos del patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa testigo siendo éstas menores del 1 y 3 %, respectivamente. Esta alta repetibilidad y reproducibilidad en tiempo de retención indica que se puede utilizar la posición de los picos cromatográficos como criterio de identificación de género.



**Figura 9.** Repetibilidad y reproducibilidad del tiempo de retención de los picos del patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1  
n= 6 análisis en el mismo día del mismo cultivo  
n= 21 análisis de diferentes cultivos

En la figura 10 se muestra la repetibilidad y reproducibilidad de la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa testigo. Para todos los picos la repetibilidad fue menor del 10 % y en la reproducibilidad son evidentes dos grupos de picos cromatográficos (A, B, D, E y F con C.V. < 26 % y C, G, H e I > 50 %). Por lo tanto la altura relativa de los picos A, B, D, E y F junto con los tiempos de retención respectivos se pueden utilizar en la identificación de la cepa testigo (tabla 3), no así los picos C, G, H e I.



**Figura 10.**

Repetibilidad y reproducibilidad de la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1

n= 6 análisis en el mismo día del mismo cultivo

n= 21 análisis de diferentes cultivos



**Tabla 3. Reproducibilidad del tiempo de retención y altura relativa de los picos cromatográficos diagnósticos en la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1.**

<b>Picos Cromatográficos</b>	<b>Tiempo de Retención (<math>\bar{X} \pm S</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Altura Relativa (<math>\bar{X} \pm S</math>)<sup>b</sup></b>
<b>A</b>	<b>4.5 ± 0.13</b>	<b>0.04 ± 0.008</b>
<b>B</b>	<b>4.7 ± 0.13</b>	<b>0.14 ± 0.023</b>
<b>D</b>	<b>5.1 ± 0.13</b>	<b>0.27 ± 0.053</b>
<b>E</b>	<b>5.4 ± 0.14</b>	<b>0.25 ± 0.066</b>
<b>F</b>	<b>5.7 ± 0.15</b>	<b>0.12 ± 0.022</b>

n = 21

a) C.V. < 3%

s = desviación estándar

b) C.V. < 26%

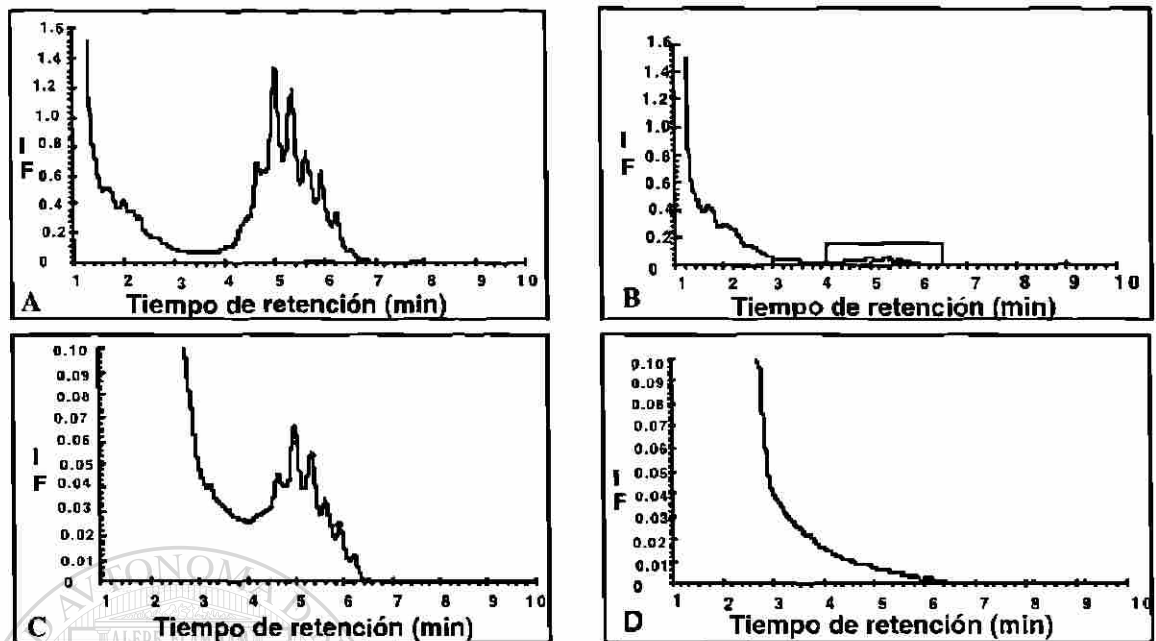
X = media

### 3.3 Determinación del límite de detección del método de análisis con la cepa testigo *Nocardia brasiliensis*

HUJEG-1

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La figura 11 muestra los patrones cromatográficos obtenidos a diferentes concentraciones bacterianas de la cepa testigo. A la concentración bacteriana de  $2.6 \times 10^5$  UFC/mL todavía se observa bien definido el patrón cromatográfico (figura 10C), sin embargo a la concentración bacteriana de  $2.6 \times 10^4$  UFC/mL ya no es posible observar este patrón (figura 10D).



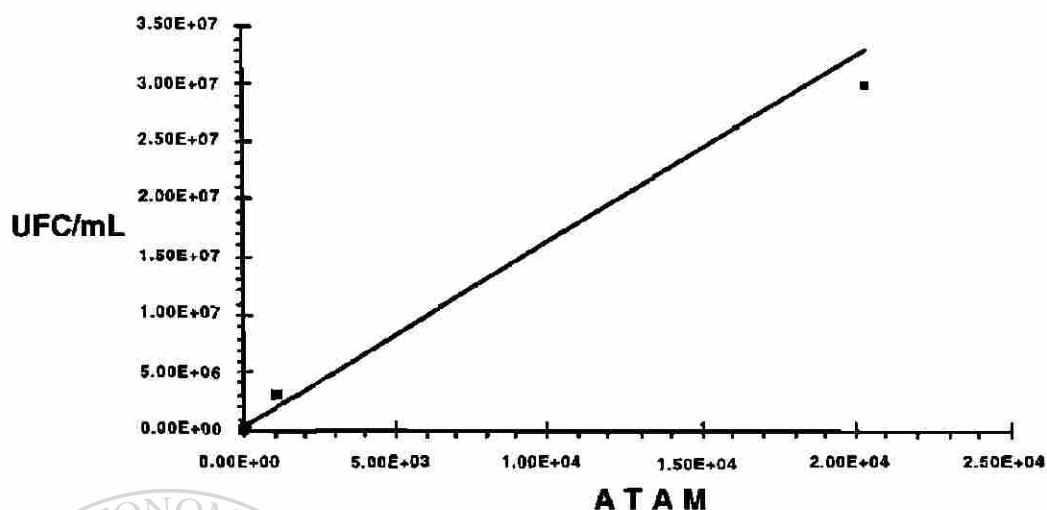
**Figura 11.**

Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 A)  $2.6 \times 10^6$  UFC/mL, B)  $2.6 \times 10^5$  UFC/mL, C) aumento de la zona entre 4 - 6.7 min de  $2.6 \times 10^5$  UFC/mL, D) aumento de la zona entre 4 - 6.7 min de  $2.6 \times 10^4$  UFC/mL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Mediante un análisis de regresión lineal de la relación del ATAM con UFC/mL, se obtuvo el punto de corte con el eje de ordenadas ( $r^2 = 0.9998$ , figura 12), el cual se asignó al límite de detección; por lo tanto se estableció como límite de detección del método analítico  $1.76 \times 10^5$  UFC/mL para la cepa testigo. Si el número de microorganismos en una lesión clínica estuviera por debajo del límite de detección de este método analítico se tendría un falso negativo.



**Figura 12.** Límite de detección del método con la cepa *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1  $r^2 = 0.9998$   $b = 1.74 \times 10^5$

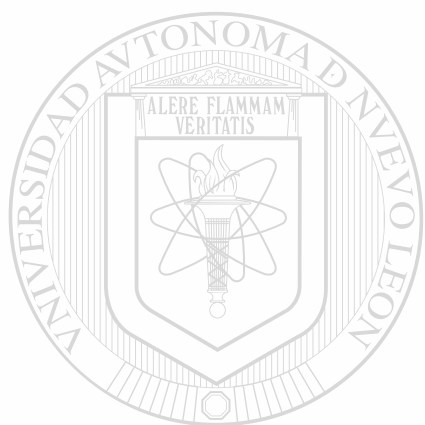
### 3.4 Obtención de los patrones cromatográficos de ácidos

micólicos de diferentes géneros

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la figura 13 se muestran los patrones cromatográficos de los derivados fluorescentes de ácidos micólicos obtenidos para las cepas *N. brasiliensis* HUJEG-1 (12A), *Rhodococcus equi* ENCB-3117 (12B), *N. brasiliensis* ENCB-7571 (12C), *N. asteroides* ENCB-7570 (12D) y *Actinomadura madurae* TMC-0401 (12E). Los picos cromatográficos comprendidos en el intervalo de 4.4 - 6.5 min corresponden a los ácidos micólicos de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1 (12A), los de intervalo de 1.7 - 2.8 min para la cepa *R. equi* ENCB-3117 (12B), los comprendidos en el intervalo

de 4.3 - 5.7 min para la cepa *N. brasiliensis* ENCB-7571 (12C), los del intervalo de 4.7 - 6.6 para la cepa *N. asteroides* ENCB-7570 (12D) y para la cepa *Actinomadura madurae* TMC-0401 se observa ausencia de picos cromatográficos en el intervalo de 1.7 - 10 min que corresponde a los ácidos micólicos (12E).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

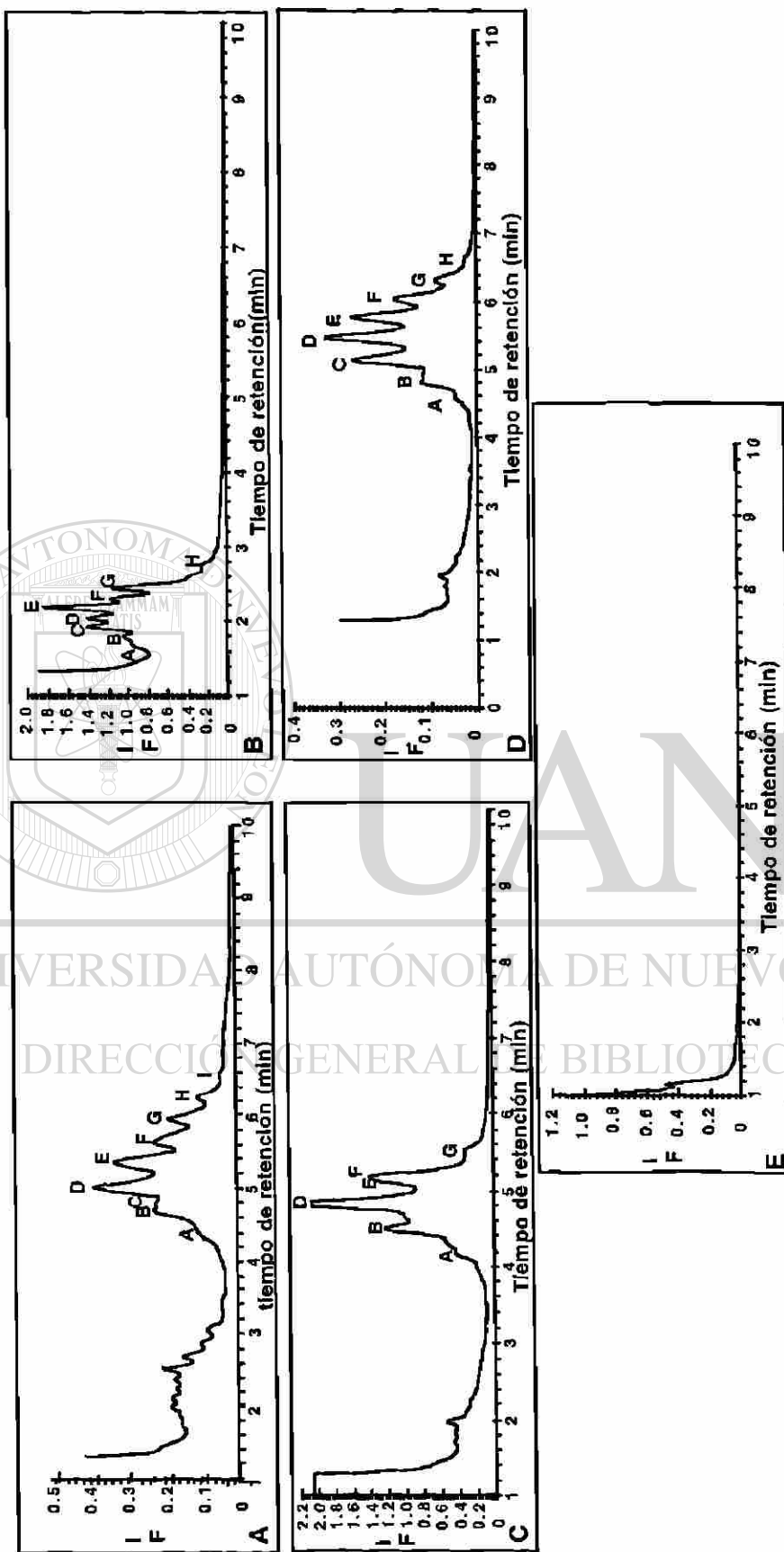
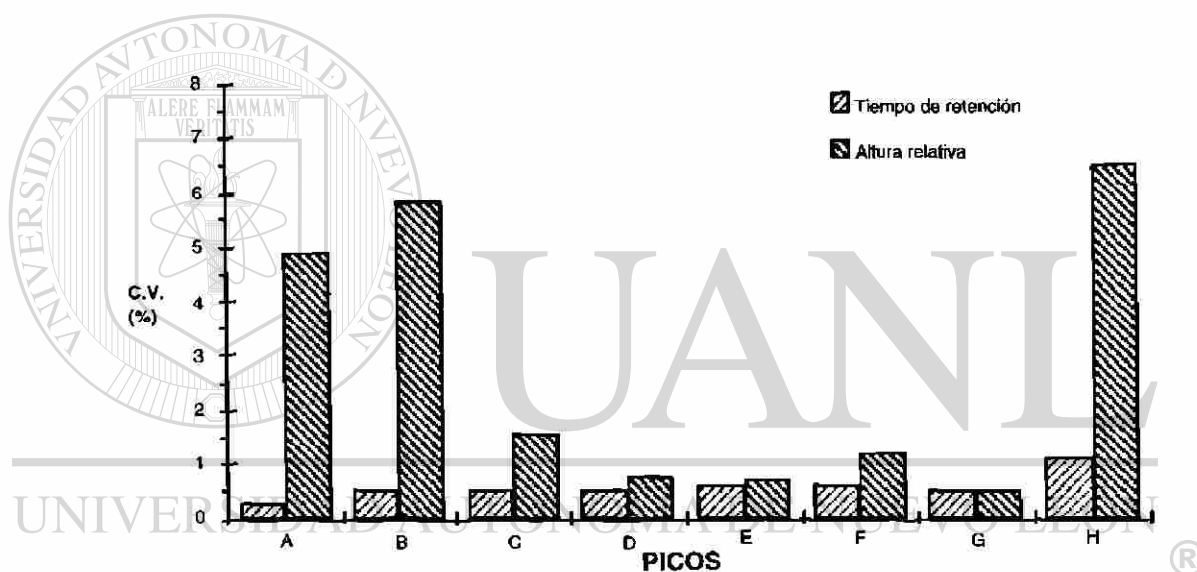


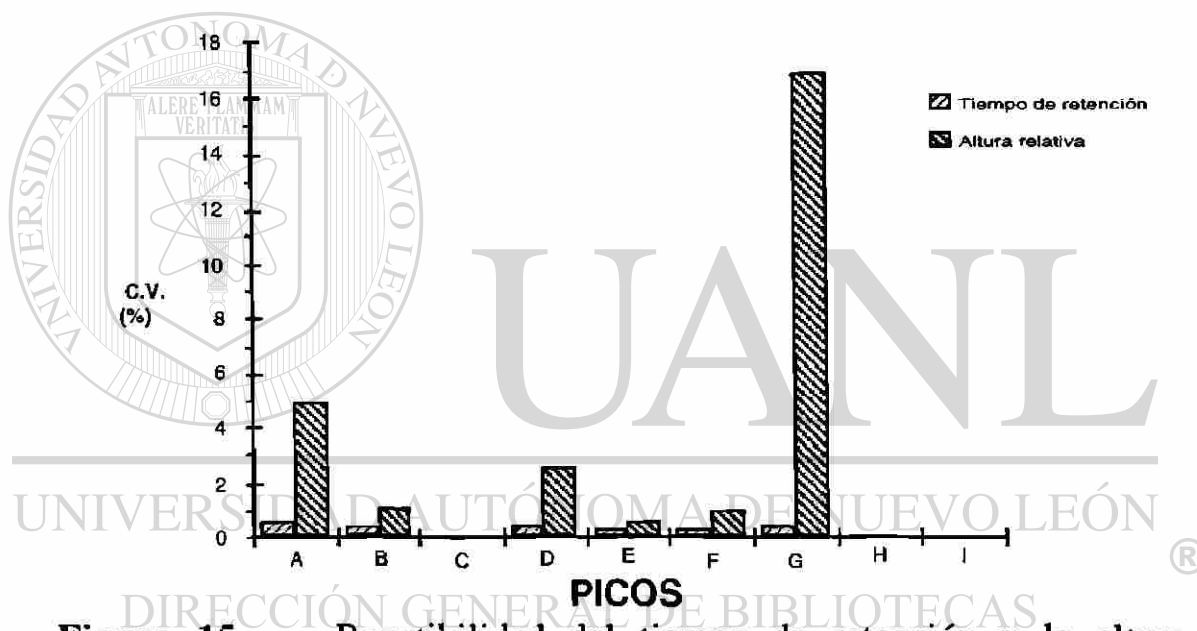
Figura 13. Patrones cromatográficos de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de A) *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, B) *Rhodococcus equi* ENCB-3117, C) *N. brasiliensis* ENCB-7571, D) *N. asteroides* ENCB-7570 y E) *Actinomadura madurae* TMC-0401

En la figura 14 se muestra la repetibilidad del ATAM, tiempo de retención y altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de los derivados fluorescentes de la cepa *R. equi* ENCB-3117, se obtuvo una repetibilidad del ATAM del 5.8 %. Para todos los picos la repetibilidad en tiempo de retención fue menor del 1 % y en altura relativa menor del 7 %.



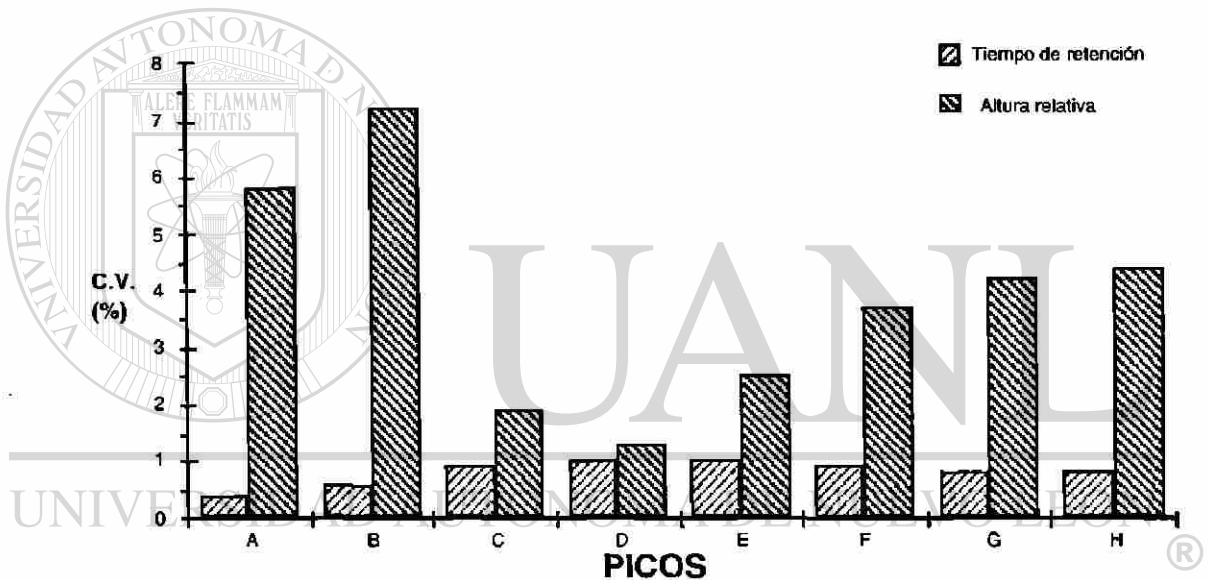
**Figura 14.** Repetibilidad del tiempo de retención y la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de la cepa *Rhodococcus equi* ENCB-3117  
 ATAM  $549 \pm 32$  C.V. 5.8%  
 n= 3 análisis en mismo día, mismo cultivo

En la figura 15 se muestra la repetibilidad del ATAM, tiempo de retención y altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de los derivados fluorescentes de la cepa *N. brasiliensis* ENCB-7571, se obtuvo una repetibilidad del ATAM del 3.3 %. Para todos los picos la repetibilidad en tiempo de retención fue menor de 1 % y en altura relativa menor del 17 %.



**Figura 15.** Repetibilidad del tiempo de retención y la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de la cepa *Nocardia brasiliensis* ENCB-7571  
 ATAM  $545 \pm 18$  C.V. 3.3%  
 n= 3 análisis en mismo día, mismo cultivo

En la figura 16 se muestra la repetibilidad del ATAM, tiempo de retención y altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de los derivados fluorescentes de la cepa *N. asteroides* ENCB-7570, se obtuvo una repetibilidad del ATAM del 12.3%. Para todos los picos la repetibilidad en tiempo de retención fue menor de 1 % y en altura relativa menor del 8 %.



**Figura 16.** Repetibilidad del tiempo de retención y la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de la cepa *Nocardia asteroides* ENCB-7570  
 ATAM  $1441 \pm 177$  C.V. 12.3%  
 n= 3 análisis en mismo día, mismo cultivo



### 3.5 Caracterización y comparación de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros

Con estos patrones, en la figura 17 se propone un esquema de diferenciación de actinomicetos con base en la presencia o ausencia de picos cromatográficos correspondientes a ácidos micólicos, siendo el control negativo la cepa *A. madurae* TMC-0401 de este estudio. De acuerdo a lo anterior, considerando el tiempo de retención existen cuatro posibles patrones cromatográficos: 1) Ausencia de picos cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención de 1.7 - 10.0 indicaría géneros de actinomicetos que carecen de ácidos micólicos como por ejemplo *Actinomadura*, *Streptomyces*, etc. 2) Presencia de 9 picos cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención de 1.7 - 2.8 minutos indicaría el género *Rhodococcus*, 3) Presencia de 6 a 9 picos cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención de 4.3 - 6.6 minutos indicaría el género *Nocardia* y 4) Presencia de picos cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención de 7.5 - 10.0 minutos indicaría el género *Mycobacterium* (18). En el caso de *Nocardia* es posible diferenciar especies ya que la presencia de 8 picos en el intervalo de tiempo de retención de 4.7 - 6.6 indicaría *N. asteroides*, y la presencia de al menos 5 picos en el intervalo de tiempo de retención de 4.3 - 6.5 min y la relación de alturas de éstos indicaría *N. brasiliensis* (Tabla 3).

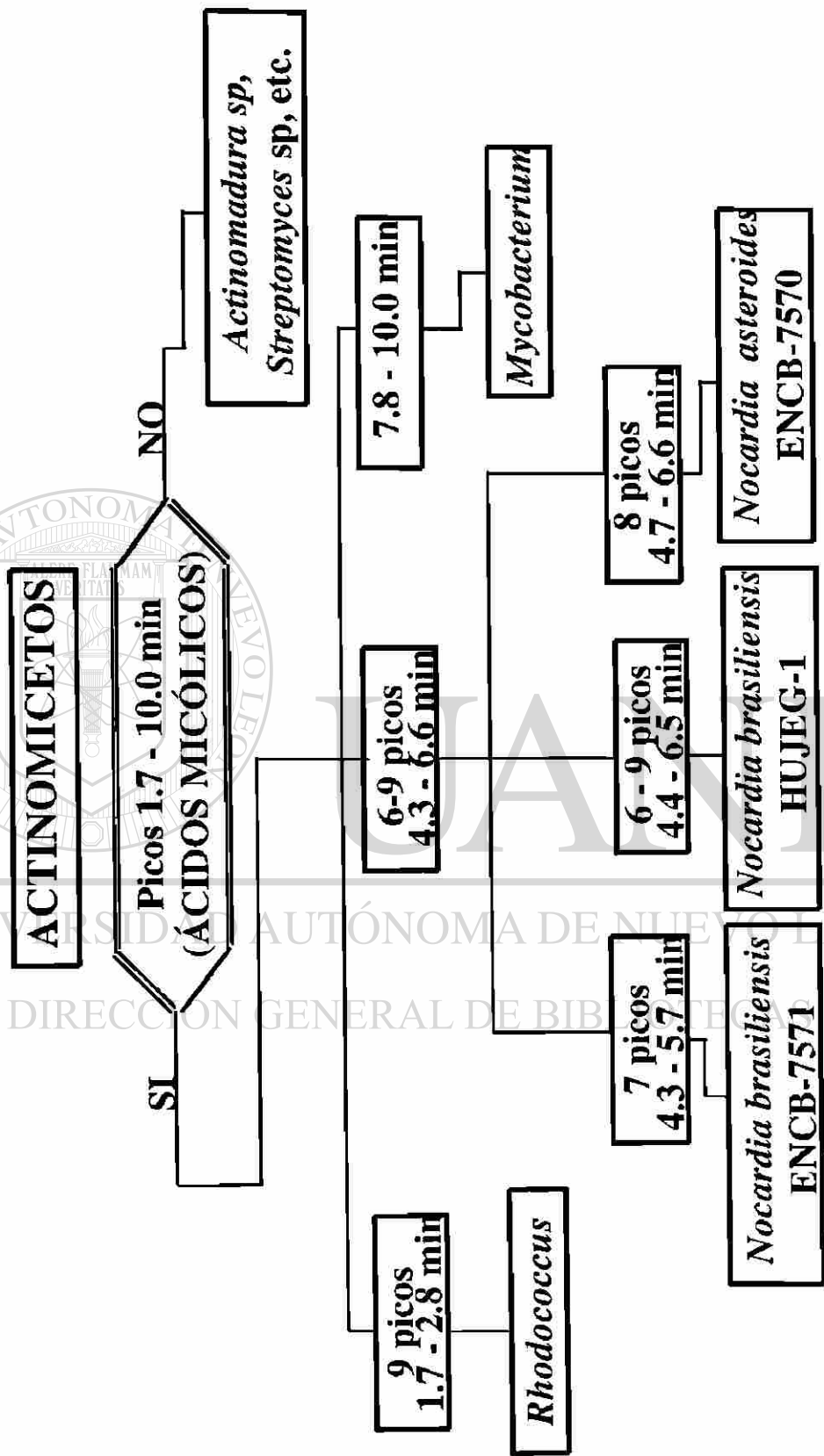
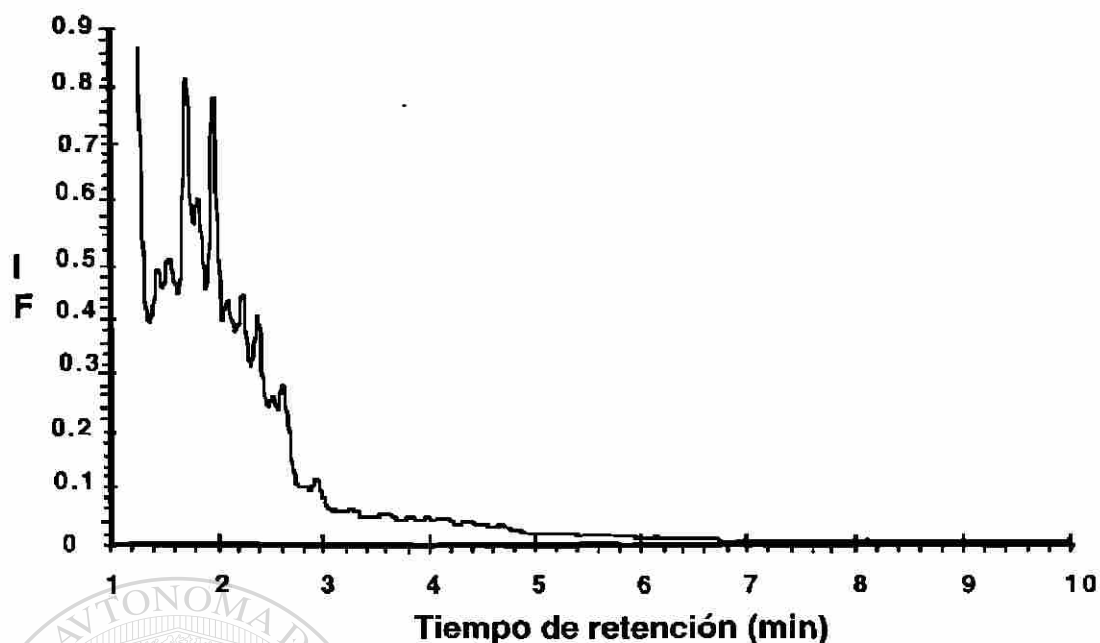


Figura 17. Esquema de diferenciación de Actinomycetos mediante el análisis de derivados fluorescentes de ácidos micólicos

### 3.6 Análisis de muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma

Después de estandarizar el método analítico y determinar los patrones cromatográficos de las cepas investigadas (*N. brasiliensis* HUJEG-1, *Rhodococcus equi* ENCB-3117, *N. brasiliensis* ENCB-7571, *N. asteroides* ENCB-7570 y *Actinomadura madurae* TMC-0401), se aplicó este método a muestras de tejido infectado de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma.

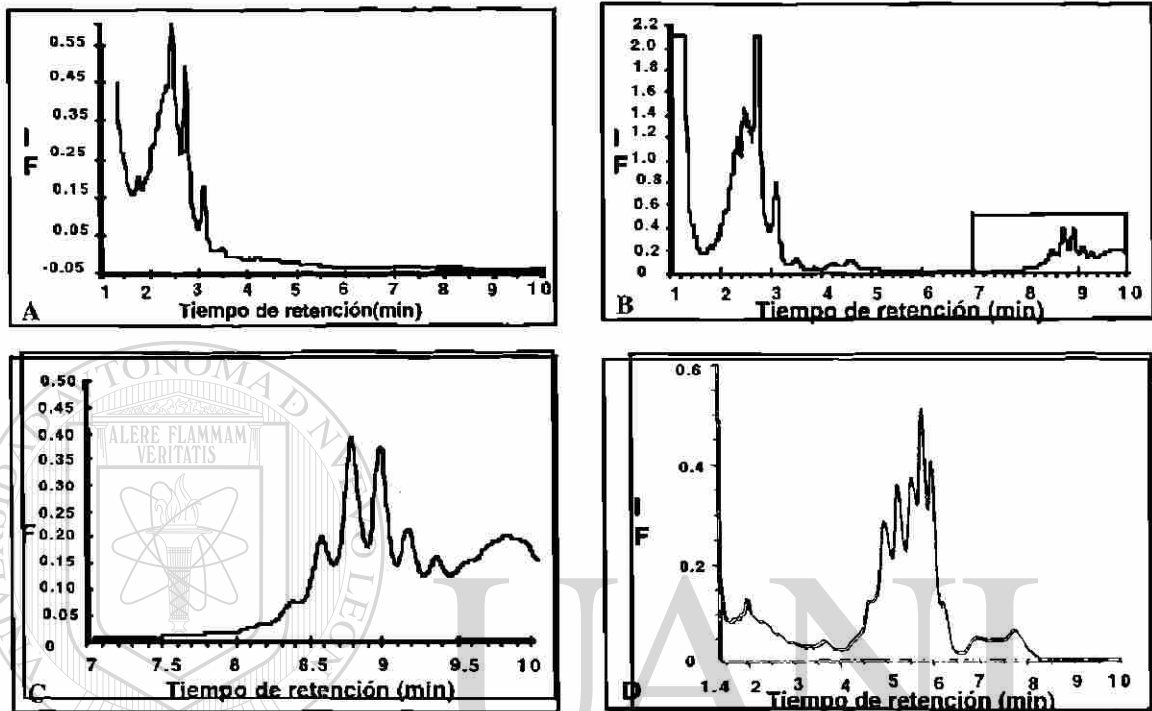
En la figura 18 se muestra el patrón cromatográfico obtenido de una biopsia de piel sana (testigo) en el cual hay 2 picos bien definidos que se encuentran a un tiempo de retención menor de 2.0 minutos. Es de notar que la muestra con que se realizó el cromatograma de esta biopsia de piel sana estaba 100 veces más concentrada que la muestra del primer paciente (figura 19A), 10 veces más concentrada que las muestras de los pacientes segundo y cuarto (figuras 20A y 22A), y 500 veces más concentrada que la muestra del tercer paciente (figura 21A).



**Figura 18.** Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes a partir de biopsia testigo

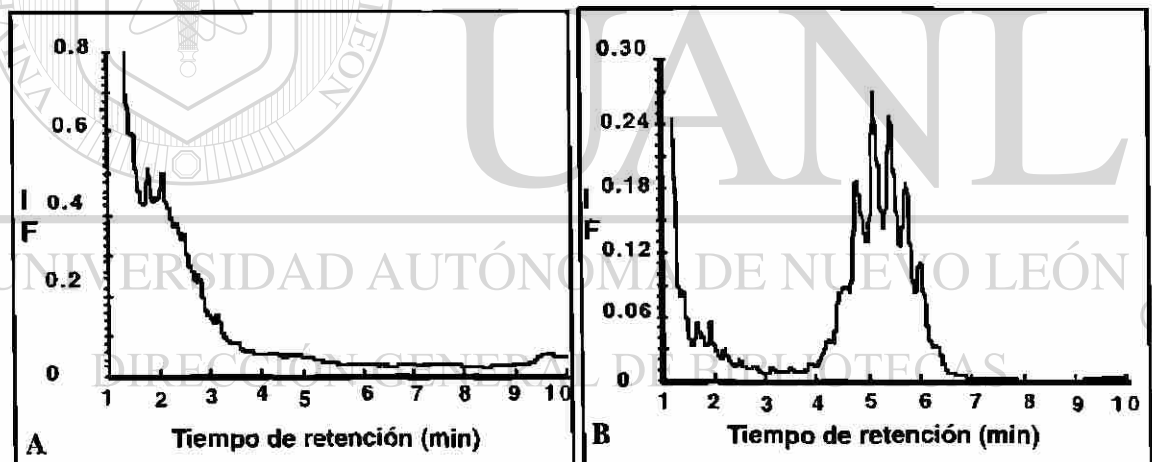
En la figura 19 se muestra el análisis cromatográfico de una biopsia (19A), y el cultivo aislado de esta biopsia (19B y C) del primer paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma. En el análisis directo de la biopsia se obtuvieron picos en la zona del género *Rhodococcus* (1.7 - 2.8 min). En el análisis cromatográfico del cultivo aislado se obtuvo una señal cromatográfica muy semejante a la anterior en esta zona, pero adicionalmente se obtuvo el patrón cromatográfico correspondiente a *Mycobacterium tuberculosis* (19B y C)(32). Adicionalmente, este cultivo se identificó como *Mycobacterium tuberculosis* mediante pruebas bioquímicas tradicionales (33). Cuatro meses después se realizó otro estudio microbiológico a este paciente y se obtuvo un cultivo con un patrón de ácidos micólicos característico del género *Nocardia* (picos entre 4.3 - 6.6 min, figura 19D). Sin embargo, este cultivo se identificó como

*N. brasiliensis* mediante pruebas bioquímicas (caseína positiva, crecimiento en gelatina positivo, hipoxantina positiva y tirosina positiva).



**Figura 19.** Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de muestra del primer paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma en muslo derecho, tratamiento con amikacina y trimetoprim-sulfametoxazol A) biopsia, B) cultivo aislado identificado como *Mycobacterium tuberculosis* por pruebas bioquímicas, C) cultivo aislado, ampliación de la zona 7 - 10 min, D) cultivo aislado cuatro meses después identificado como *Nocardia brasiliensis*

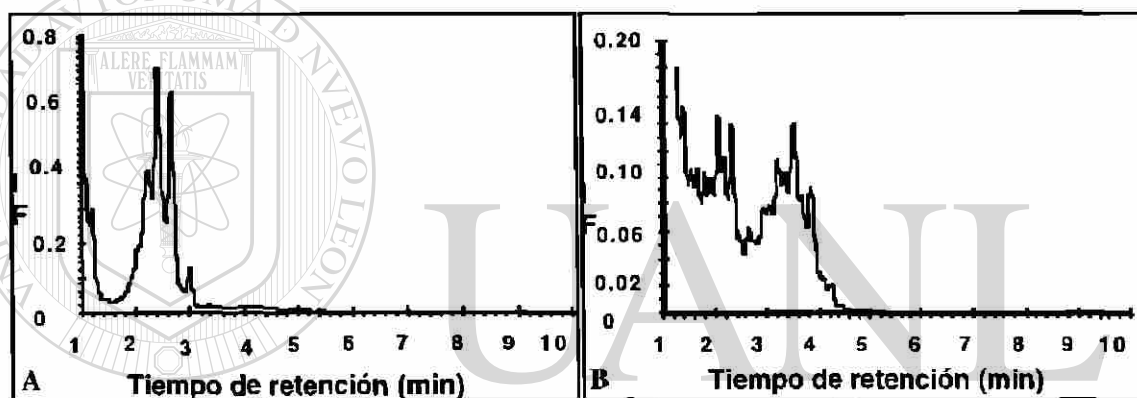
En la figura 20 se muestra el análisis cromatográfico de una biopsia del segundo paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma, tomada dos meses después de haber iniciado el tratamiento con antimicrobianos, y el cultivo aislado de otra biopsia tomada antes de iniciarse el tratamiento. En el análisis directo de la biopsia no se obtuvieron picos cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención de 1.7 - 10.0 min (figura 20A). En el análisis del cultivo aislado se obtuvieron picos cromatográficos en la zona del género *Nocardia* (4.3 - 6.6 min, figura 20B). Sin embargo este cultivo se identificó como *N. brasiliensis* mediante pruebas bioquímicas (caseína positiva, crecimiento en gelatina positivo, hipoxantina positiva y tirosina positiva).



**Figura 20.**

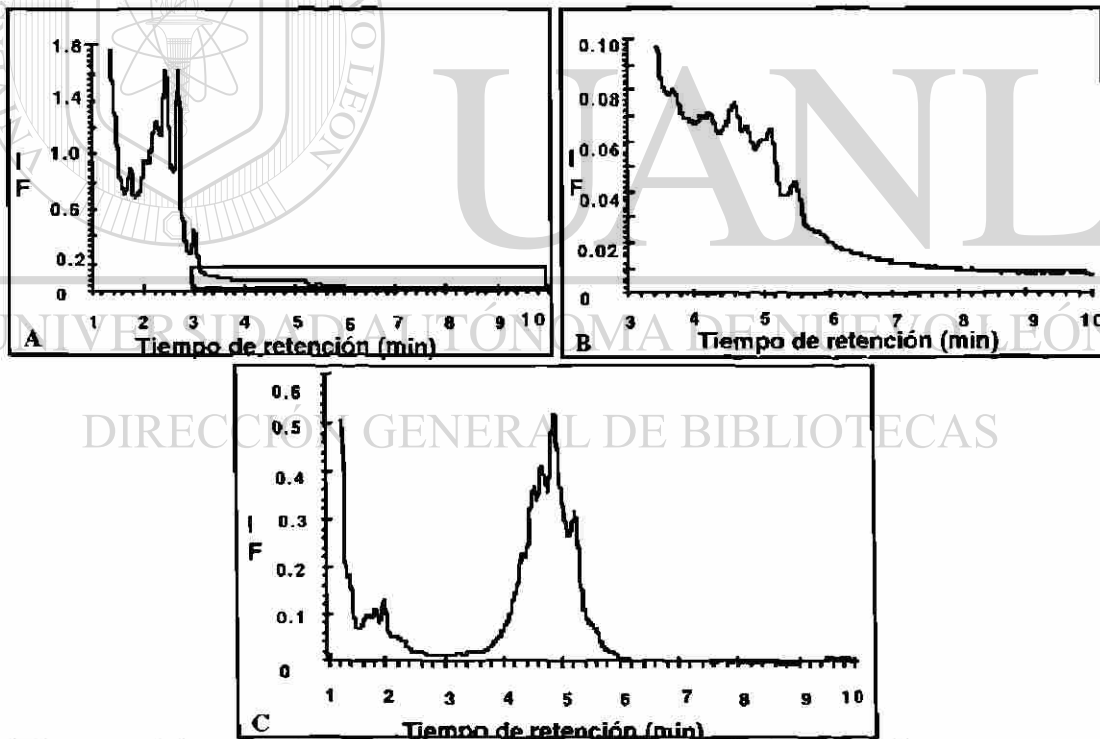
Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra del segundo paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma en cara posterior del tórax, tratamiento con amikacina y trimetoprim-sulfametoxazol A) biopsia dos meses después de iniciado el tratamiento, B) cultivo aislado antes de iniciar el tratamiento identificado como *Nocardia brasiliensis* por pruebas bioquímicas (caseína positivo, crecimiento en gelatina positivo, hipoxantina positivo, tirosina positivo)

En la figura 21 se muestra el análisis cromatográfico de una biopsia y el cultivo mixto de esta biopsia del tercer paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma antes de iniciar el tratamiento con antimicrobianos. En el análisis directo de la biopsia se obtuvieron picos en la zona del género *Rhodococcus* de 1.7 - 2.8 min (figura 21A). En el análisis cromatográfico del cultivo se obtuvo una señal cromatográfica muy semejante a la anterior (1.7 - 2.8 min) y otra en la zona de 3.0 - 4.0 min (21B).



**Figura 21.** Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra del tercer paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma en brazo derecho, sin tratamiento A) biopsia, B) cultivo mixto con morfología colonial de actinomiceto y otra bacteria

En la Figura 22 se muestra el análisis cromatográfico de una biopsia y del cultivo aislado de esta biopsia del cuarto paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma. En el análisis directo de la biopsia se obtuvieron picos muy pequeños en la zona del género *Nocardia* (picos entre 4.3 - 6.6 min, figura 22A). En el análisis cromatográfico del cultivo aislado, el cual presentó morfología colonial de actinomiceto, también se obtuvieron picos cromatográficos en la zona del género *Nocardia* (figura 22B). Posteriormente se le identificó como *N. brasiliensis* mediante pruebas bioquímicas (caseína positiva, crecimiento en gelatina positivo, hipoxantina positiva y tirosina positiva).



**Figura 22.** Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de muestra del cuarto paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma en axila, sin tratamiento con antimicrobianos, A) biopsia, B) biopsia aumento de la zona entre 3.5 - 6.0 min, C) cultivo aislado identificado como *Nocardia*



## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Preparación del material biológico

El medio más utilizado para el cultivo de actinomicetos es el caldo de infusión cerebro-corazón (7,12,13,14,34), sin embargo en este estudio se optó por usar el caldo Rivas. Este medio además de su costo bajo, emplea como fuente de nitrógeno extracto de levadura e hidrolizado de peptonas y de colágeno y como fuente de carbono glucosa a un pH de 7.0, requerimientos y condiciones recomendadas en la literatura para el desarrollo óptimo de actinomicetos (13,14,28,29).

La mayoría de los actinomicetos presentan un desarrollo apreciablemente más lento que otras bacterias. *Rhodococcus equi* es considerado un actinomiceto de crecimiento rápido. En el presente trabajo el desarrollo de la cepa *R. equi* ENCB-3171 fue apreciable a partir de las 4 h de haber iniciado su cinética de crecimiento, llegando a la fase logarítmica tardía en 26 h, esto es muy semejante a lo reportado en la literatura en la cual se indica que a las 2 h de incubación ya es apreciable su crecimiento y alcanza la fase logarítmica tardía después de 24 h (1,24). La cepa *N. asteroides* ENCB-7570 tardó 55 h en alcanzar la fase logarítmica tardía y la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1 a las 50 h llegó a esta fase de crecimiento, estos tiempos fueron relativamente cercanos al reportado para *Nocardia asteroides* que inicia su fase logarítmica a las 16 h y tarda 48 h en alcanzar la fase logarítmica tardía (13,2,34). Esto nos confirma que la mayoría de las bacterias del género *Nocardia* crecen bien

sobre una variedad de medios de cultivo, aunque comparadas con una bacteria típica tienen un crecimiento más lento. El desarrollo de la cepa *A. madurae* TMC-0401 fue apreciable a las 64 h, alcanzando la fase logarítmica tardía a las 120 h, de ahí que se ha considerado un actinomiceto de lento crecimiento en comparación con otros actinomicetos (13,14).

#### 4.2 Análisis de ácidos micólicos de la cepa testigo

Los laboratorios clínicos microbiológicos y de referencia han experimentado dificultades para diferenciar un microorganismo de los cuatro géneros de actinomicetos estrechamente relacionados, cuando sólo se recurre a características de crecimiento, pruebas bioquímicas y tinciones ácido-alcohol resistente; por lo tanto, es importante contar con suficientes herramientas que al conjuntarlas permitan lograr esta diferenciación. Con este propósito en el presente trabajo se ha empleado el análisis de ácidos micólicos por CLAR, con diversas modificaciones para lograr una mayor efectividad en la diferenciación de actinomicetos.

Estudios previos han demostrado que el patrón cromatográfico de derivados p-bromofenacílicos de ácidos micólicos que absorben ultravioleta de *Nocardia* es diferente al de otros géneros que contienen ácidos micólicos (15,16). En el presente trabajo se describió el primer patrón cromatográfico de derivados fluorescentes (cumarínicos) de ácidos micólicos de *Nocardia brasiliensis*. Los tiempos de retención de este patrón cromatográfico fueron diferentes a los reportados anteriormente

para derivados de ácidos micólicos que absorben radiación ultravioleta (p-bromofenacílicos) (16). Sin embargo, la forma del patrón cromatográfico descrito es muy similar al reportado, tanto en el número de picos como en alturas relativas, ya que las alturas relativas de los tres picos diagnósticos más importantes (D, E y F) descritas en los trabajos previos, quedan dentro del intervalo de altura relativa de una desviación estándar determinado en el presente trabajo (tabla 3). Por lo tanto cuando se emplee el agente fluorescente cumarínico para la detección de ácidos micólicos de *Nocardia* se podrán usar los patrones cromatográficos reportados para derivados p-bromofenacílicos como patrones de referencia y se presupone que se podrían emplear también como patrones cromatográficos de referencia de otros géneros.

Existen pocos estudios de repetibilidad y reproducibilidad del patrón de ácidos micólicos de los géneros *Rhodococcus* y *Nocardia*. Butler et al. en 1987 evaluaron la reproducibilidad del tiempo de retención y la forma del patrón cromatográfico de ácidos micólicos al analizar diferentes cepas de una misma especie de los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* (16). Además determinaron la reproducibilidad del tiempo de retención con una sola especie del género *Rhodococcus* haciendo diez inyecciones repetidas de los ácidos micólicos extraídos de la cepa *R. rhodochrous* y sólo reportan como valor numérico de reproducibilidad el error estándar del tiempo de retención (0.1 min). Sin embargo, en el presente trabajo se evaluó la repetibilidad del ATAM la cual fue de 4% en la cepa testigo. Además se evaluaron la repetibilidad y reproducibilidad del tiempo de retención y altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de la cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1. La alta repetibilidad y reproducibilidad en tiempo de retención

(menores de 1 y 3% respectivamente) obtenidas permiten utilizar la posición de los picos cromatográficos como un criterio de identificación de género. A pesar de obtener una buena repetibilidad de la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico (menor del 10 %), en la reproducibilidad fueron evidentes dos grupos de picos cromatográficos (A, B, D, E y F con C.V. < 26% y C, G, H e I > 50%), a los primeros se les designó picos diagnósticos los cuales pueden ser útiles en la identificación de la cepa testigo.

#### **4.3 Determinación del límite de detección del método de análisis con la cepa testigo *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1**

Se ha reportado como límite de detección en el análisis de derivados p-bromofenacílicos de ácidos micólicos de *Mycobacterium kansasii*  $2.5 \times 10^6$  UFC/mL (17). El reactivo derivatizante 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina que reacciona con ácidos carboxílicos para formar ésteres fluorescentes tiene un límite de detección para ácidos grasos de menos de 5 pg (35), además el límite de detección para un derivado fluorescente, generado con la cumarina anterior, de un estándar sintético de alto peso molecular de ácidos micólicos fue aproximadamente de 15.3 fmol en comparación con 3.1 pmol para un derivado p-bromofenancílico del mismo estándar, por lo tanto los derivados fluorescentes de ácidos micólicos son al menos 200 veces más sensibles que los derivados p-bromofenacílicos (20). Hasta el momento, no se ha reportado el límite de detección para el análisis de ambos derivados de ácidos micólicos a partir

de cepas de *Nocardia*, en este trabajo se estableció como límite de detección  $1.76 \times 10^5$  UFC/mL para la cepa testigo *N. brasiliensis* HUJEG-1, el cual es menor que el reportado en el análisis de derivados p-bromofenacílicos de ácidos micólicos de micobacterias (17) y es un poco mayor que el valor que se podría estimar para los derivados fluorescentes de ácidos micólicos de micobacterias ( $10^4$  UFC/mL), teniendo en cuenta los límites de detección de los derivados fluorescente y p-bromofenacílico del estándar sintético de alto peso molecular de ácidos micólicos reportados (20).

#### **4.4 Obtención de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de diferentes géneros**

Los ácidos micólicos han sido empleados como criterio de diferenciación de microorganismos que los poseen, como por ejemplo, los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*; ya que el número de átomos de carbono de los ácidos micólicos varían con el género (15,16,17,18,36), ha sido posible diferenciar un género de otro con base al tiempo de retención y la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de ácidos micólicos. En las condiciones cromatográficas empleadas en el presente trabajo los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* fácilmente son diferenciados por el intervalo del tiempo de retención en el cual se detecta su patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos, sin tener que utilizar la altura relativa de los picos del patrón cromatográfico de ácidos micólicos.

Al analizar la cepa de *N. asteroides* ENCB-7570 se describió el patrón cromatográfico similar a los reportados para derivados p-bromofenacílicos de ácidos micólicos de este microorganismo por Butler et al. (16), con un intervalo de tiempo de retención diferente, y al reportado recientemente por Wilson et al. (37), con un intervalo de tiempo de retención semejante (5.0 - 7.0 min), esto bajo condiciones de análisis diferentes a las empleadas en este trabajo (diferentes derivados de ácidos micólicos, columna, detector y gradiente de elución). Esto reafirma que cuando se emplee el agente fluorescente cumarínico para la detección de ácidos micólicos de *Nocardia* se podrán usar los patrones cromatográficos reportados para derivados p-bromofenacílicos como patrones de referencia y se presupone que se podrían emplear también como patrones cromatográficos de referencia de otros géneros.

#### **4.5 Análisis de muestras clínicas de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma**

Contando con el método analítico estandarizado y con los diferentes patrones cromatográficos de los derivados fluorescentes de las cepas estudiadas como referencia se aplicó esta metodología a muestras de tejido de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma y a los aislamientos clínicos de éstos.

En el análisis de una biopsia de piel sana (Figura 18) se obtuvo un patrón cromatográfico en el cual hay dos picos bien definidos que se encuentran a un tiempo de retención menor de 2.0 min. A pesar de que se

encuentran en la zona del género *Rhodococcus* difiere de éste en que el género *Rhodococcus* presenta un pico característico a un tiempo de retención de 2.2 min.

En el análisis de la biopsia del primer paciente se obtuvo un patrón cromatográfico en el cual hay picos en la zona del género *Rhodococcus*. En el análisis del cultivo aislado de esta misma biopsia se obtuvo un patrón cromatográfico mixto con picos en la zona del género *Rhodococcus* y el patrón cromatográfico de *Mycobacterium tuberculosis*. Además este cultivo fue identificado como *M. tuberculosis* por pruebas bioquímicas tradicionales(33), permitiendo correlacionar el patrón cromatográfico obtenido con las pruebas bioquímicas. Cuatro meses después se realizó otro estudio microbiológico a este paciente, de donde se obtuvo un cultivo con un patrón cromatográfico característico del género *Nocardia* sin poder discernir entre especies por este método. Por otro lado, este cultivo se identificó como *N. brasiliensis* mediante pruebas bioquímicas, pudiendo en este caso identificar del cultivo de una biopsia el género del microorganismo presente mediante el patrón cromatográfico de ácidos micólicos. La ausencia de picos cromatográficos en el intervalo del género *Nocardia* en la muestra de la biopsia puede haber sido debido a que el número de microorganismos presentes en ésta hubiera sido inferior al límite de detección del método analítico. Por último el no detectar *Mycobacterium tuberculosis* en el segundo cultivo nos indica una posible contaminación del primer cultivo.

Al analizar la biopsia del segundo paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma no se obtuvieron picos cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención para ácidos micólicos (1.7 - 10.0 min)



(Figura 20), esto podría deberse a que el paciente ya había iniciado el tratamiento con antimicrobianos al momento de tomarse la biopsia para el análisis cromatográfico. En el análisis del cultivo aislado de otra biopsia tomada antes de iniciarse el tratamiento se obtuvieron picos cromatográficos en el intervalo del género *Nocardia* sin poder discernir entre especies por este método, este mismo cultivo fue identificado como *N. brasiliensis* mediante pruebas bioquímicas (Figura 20).

En los análisis cromatográficos de la biopsia y del cultivo mixto de la biopsia del tercer paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma (Figura 21) se obtuvieron picos cromatográficos en la zona del género *Rhodococcus* muy semejantes en ambos patrones cromatográficos, además se obtuvo otra señal cromatográfica en el análisis del cultivo mixto en la zona intermedia entre *Rhodococcus* y *Nocardia* (3.0 - 4.0 min), sin poder discernir entre géneros de actinomicetos, pero si nos confirma la morfología colonial de un actinomiceto, ya que fue posible detectar ácidos micólicos de actinomiceto. No fue posible el aislamiento del cultivo puro con morfología colonial de actinomiceto, por lo tanto no se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación de este cultivo.

En el análisis de la biopsia del cuarto paciente con cuadro clínico presuntivo de micetoma (Figura 22). En el patrón cromatográfico sólo se detectaron picos muy pequeños en la zona del género *Nocardia* pero sin observarse un patrón definido, probablemente la concentración bacteriana se encontraba por debajo del límite de detección de este método. En el análisis cromatográfico del cultivo aislado de la biopsia antes mencionada, también se obtuvieron picos en la zona del género *Nocardia* de mayor tamaño que en el análisis de la biopsia directa, esto concuerda con la



morfología colonial reportada para este aislamiento clínico, pero no fue posible discernir entre especies por este método, posteriormente se identificó como *N. brasiliensis* por pruebas bioquímicas.

Los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras de biopsias de los cuatro pacientes analizadas no mostraron picos de ácidos micólicos en el intervalo de tiempo de retención del género *Nocardia*, probablemente debido a que la concentración bacteriana se encontraba por debajo del límite de detección.

Como se indicó la repetibilidad y reproducibilidad en tiempo de retención y altura relativa para los picos diagnósticos A, B, D, E y F en la cepa testigo fue muy buena, sin embargo en cuanto se ha trabajado con otras cepas de *Nocardia* provenientes de pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma se obtuvieron patrones cromatográficos en el intervalo de tiempo de retención del género *Nocardia*, pudiendo así identificar el género, que no coinciden en su forma con la cepa testigo, aunque si coinciden las pruebas bioquímicas con *N. brasiliensis*. Esto indicaría que debe de ser evaluada la reproducibilidad del método analítico utilizando diversas cepas del mismo género y especie para ver si existen pequeñas diferencias en la producción de ácidos micólicos entre diversas cepas de una misma especie y así poder diferenciar variedades dentro de una misma especie. Además sería conveniente observar los cambios del patrón cromatográfico en diferentes medios de cultivo y fases de crecimiento.

## 4. CONCLUSIONES

- Se describen por primera vez el patrón cromatográfico de derivados fluorescentes (cumarínicos) de ácidos micólicos de *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia. asteroides* y *Rhodococcus equi* y fueron similares a los descritos para derivados p-bromofenacílicos, por lo tanto cuando se emplee el agente fluorescente cumarínico para la detección de ácidos micólicos de estos microorganismos se podrán usar los patrones cromatográficos reportados para derivados p-bromofenacílicos como patrones de referencia.
- Se estableció como límite de detección  $1.76 \times 10^5$  UFC/mL para la cepa testigo *N. brasiliensis* HUJEG-1, el cual es menor que el reportado en el análisis de derivados p-bromofenacílicos de ácidos micólicos de micobacterias y es un poco mayor que el valor que se podría estimar para los derivados fluorescentes de ácidos micólicos de micobacterias.
- La alta repetibilidad y reproducibilidad en tiempo de retención obtenidas permiten utilizar la posición de los picos cromatográficos como un criterio de identificación de género.
- Se designaron picos diagnósticos de la cepa testigo aquellos cuya reproducibilidad de la altura relativa fue  $< 26\%$  y por lo tanto son útiles en la identificación de esta cepa.

- Se propone un esquema de diferenciación de actinomicetos con base en la ausencia o presencia de picos cromatográficos correspondientes a ácidos micólicos y considerando número de picos del patrón cromatográfico y tiempo de retención de estos.
- Los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras analizadas de biopsias de los cuatro pacientes no mostraron picos de ácidos micólicos en el intervalo de tiempo de retención del género *Nocardia*, probablemente debido a que la concentración bacteriana se encontraba por debajo del límite de detección del método analítico.
- Los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de los cultivos de las biopsias provenientes de los cuatro pacientes con cuadro clínico presuntivo de micetoma mostraron picos de ácidos micólicos y en tres de estos se pudo identificar el género del microorganismo, aunque la forma del patrón cromatográfico no coincidió con ninguna de las cepas de referencia evaluadas.
- Sería conveniente evaluar la reproducibilidad del método analítico utilizando diversas cepas del mismo género y especie, para ver si existen pequeñas diferencias en la producción de ácidos micólicos entre diversas cepas de una misma especie y así poder diferenciar variedades dentro de una misma especie. Además sería conveniente observar los cambios del patrón cromatográfico en diferentes medios de cultivo y fases de crecimiento.

## REFERENCIAS

1. Mc Neil, M., and J. Brown. 1994. The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin. Microb. Rev.* 7: 357 - 417.
2. Lechavalier, H., and M. P. Lechevalier. 1981. The Actinomycetes. p 1913-1922. In "The Prokaryotes" A Handbook on Habitats Isolation and Identification of Bacteria.
3. Lerner P. I. 1979. Diseases due to Higher Bacteria. p. 1962-1978. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell G. L., R. G. Douglas, and J. E. Bennett. John Wiley & Sons.
4. Farer L. S. 1979. Mycobacterial Diseases. p. 1905-1962. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell G. L., R. G. Douglas, and J. E. Bennett. John Wiley & Sons.
5. Filice, G. A., P. I. Lerner 1994. Miscellaneous Bacterial Infections. p. 696-705. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Isselbacher, K. J., E. Braunwald, J. D. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci, and D. L. Kasper. 13 th, McGraw-Hill.
6. Wright P. W., R. J. Wallace, and T. M. Daniel. 1994. Mycobacterial Diseases. p. 705-718. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Isselbacher, K. J., E. Braunwald, J. D. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci, and D. L. Kasper. 13 th, McGraw-Hill

7. Delgado-Iribarren, A., S. Amich, S. Prieto, y M. L. Salve. 1994. *Micobacterias y Actinomicetos Aerobios*. p. 212-237. En *Laboratorio Clínico de Microbiología*. Interamericana, McGraw-Hill. España.
8. Serrano J. A., y A. H. Sandoval. 1992. *Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos*. Talleres Gráficos Universitarios. Coeditado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico y el Consejo de Publicaciones de la Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.
9. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male. 1996. p 17.1-17-13. *Immunology*. Mosby. 4th. London, England.
10. Lechevalier, H., M. Lechevalier., and N. Gerber. 1971. *Chemical Composition as a Criterion in the Classification of Actinomycetes*. *Adv. Appl. Microbiol.* 14: 47 - 72.
11. Lehninger, A.; et al. 1993. *Worth Publishers*. New York, N. Y.

---

12. López-Martínez, R., L. J. Méndez-Tovar, F. Hernández- Hernández, y R. Catañón-Olivares. 1995. *Micosis subcutáneas*. p. 59-66 En *Micología Médica (Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio)*. Trillas. 1a ed. México.

13. Lechevalier, H. A., and M. Goodfellow. 1989. *The Actinomycetes* III p 2344 -2572. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, J. G, Holt (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

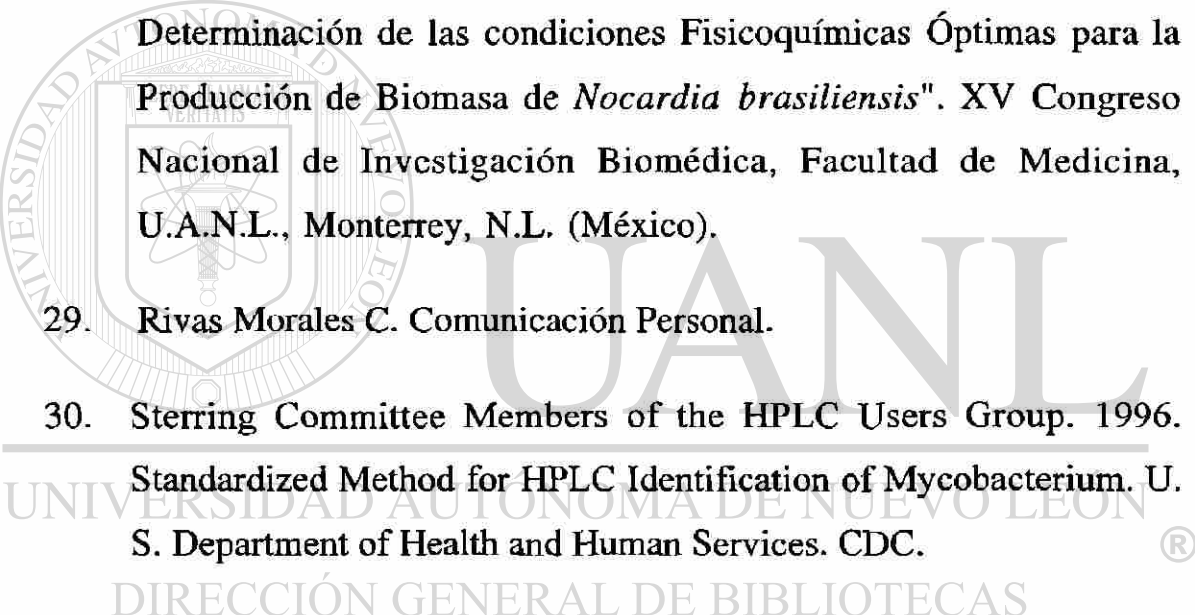
14 Goodfellow, M. 1989. *Maduromycetes*. p. 2509-2551. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, J. G, Holt (ed), *Bergey's Manual of*

Systematic Bacteriology, vol 4. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

15. Butler, W., D. Ahearn, and J. Kilburn. 1986. High Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids as a Tool in the Identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* Species. *J. Clin Microbiol.* **23**: 182 - 185.
16. Butler, W., J Kilburn, and G. Kubica. 1987. High Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids as an Aid in Laboratory Identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* Species. *J. Clin Microbiol.* **25**: 2126 - 2131.
17. Butler, W., and J Kilburn,. 1988. Identification of Major Slowly growing Pathogenic Mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by High Performance Liquid Chromatography of Their Mycolic Acids. *J. Clin Microbiol.* **26**: 50 - 53.
18. Butler, W., K. Jost, and J. Kilburn,. 1991. Identification of *Mycobacterium* by High Performance Liquid Chromatography . *J. Clin Microbiol.* **29**: 2468 - 2472.
19. Butler, W., L. Thibert, and J. O. Kilburn. 1992. Identification of *Mycobacterium avium* Complex Strain and Some Similar Species by High Performance Liquid Chromatography. *J. Clin Microbiol.* **30**: 2698 - 2704.
20. Jost, K., D. Dunbar, and S. Barth. 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* y *M. avium* complex Directly from Smear-Positive Sputum Specimens and BACTEC 12B Cultures by

High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Computer-Driven Pattern Recognition Models. *J. Clin Microbiol.* 33: 1270 - 1277.

21. Jost, K., S. Chiu, K. Posey, T. Owens, D. Dunbar, and B. Elliott. 1996. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and other Micobacteria Directly from Clinical Specimens and Cultures using an Automated High Performance Liquid Chromatography System, abstr. U-30. In 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, New Orleans, LA.
22. Garza González E., M. Guerrero Olazarán, R. Tijerina Menchaca, and J. M. Viader Salvadó. 1997. Determination of Drug Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through Mycolic Acid Analysis. *J. Clin Microbiol.* 35: 1287-1289.
- 23. — McMurray D.N. 1991. *Mycobacteria and Nocardia*. p 451-467. In *Medical Micobiology*. Baron S. 3th edition, Churchill Livingstone.
24. Beaman B. L., M. A. Saubolle, and R. J. Wallace. 1995. *Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Oerskovia, and Other Aerobic Actinomycetes of Medical Importance*. p. 379-399. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover. ASM Press, Washington, D. C.
25. Beaman, B.L., and L. Beaman. 1994. *Nocardia* Species: Host-Parasite Relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 213-264.

26. López-Martínez, R., L. J. Méndez-Tovar, F. Hernández-Hernández, y R. Catañón-Olivares. 1995. Seudomicosis Profundas. p. 131-136 En *Micología Médica (Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio)*. Trillas. 1a ed. México.
27. Bonifaz, A. 1990. Micetoma. 135-165. En *Micología Médica Avanzada*. 1a ed. Editorial Méndez Cervantes.
28. Rivas-Morales C., M. C. Salinas-Carmona, L. Galán-Wong, y H. Medrano-Rolan. 1997. "Diseño de un Medio de Cultivo y Determinación de las condiciones Fisicoquímicas Óptimas para la Producción de Biomasa de *Nocardia brasiliensis*". XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. (México).
29. Rivas Morales C. Comunicación Personal.
30. Sterring Committee Members of the HPLC Users Group. 1996. *Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacterium*. U. S. Department of Health and Human Services. CDC. 
31. Zar J.H. 1974. Single Factor Analysis of Variance. p 133-139. In "Biostatistical Analysis". McElroy W., P. Swanson. Prentice Hall Biological Sciences Series. Englewood Cliffs, N.J.
32. Garza González E., M. Guerrero Olazarán, R. Tijerina Menchaca, y J. M. Viader Salvadó. 1997. " Identificación de Micobacterias mediante el patrón de ácidos micólicos". XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. (México).



33. Llaca Diaz J. Comunicación Personal.
34. Beaman, B. L., S. E. Moring, and T. Ionedá. 1988. Effect of Growth Stage on Mycolic Acid Structure in Cell Walls of *Nocardia asteroides* GUH-2. *J. Bacteriol.* **70**: 1137-1142.
35. Farrinotti, R., P. Siart, J. Bourson, S. Kirkiacharian, B. Valuer, and G. Mahusier. 1983. 4-Bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin as a fluorescent label for carboxylic acids in chromatographic detection. *J. Chromatogr.* **296**: 81-90.
36. Floyd, M., V. A. Silcox, W. D. Jones, W.R. Butler, and J. O. Kilburn. 1992. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1327-1330.
37. Wilson, R. W., V. A. Steingrube, B. A. Brown, Z. Blacklock, K. C. Jost, A. McNabb, W. D. Colby, J. R. Biehle, J. L. Gibson, and R. J. Wallace. Recognition of a *Nocardia transvalensis* Complex by Resistance to Aminoglycosides, Including Amikacin, and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2235-2242.

