

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Identificación de aislamientos clínicos y ambientales de
Nocardia spp. mediante técnicas genómicas y proteómicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gema Carrasco Díaz

Directora

Sylvia Valdezate Ramos

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DPTO. MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



**“IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE
Nocardia spp. MEDIANTE TÉCNICAS GENÓMICAS Y PROTEÓMICAS”**

GEMA CARRASCO DÍAZ

DIRECTOR: DRA. SYLVIA VALDEZATE RAMOS

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DPTO. MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**“IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE
Nocardia spp. MEDIANTE TÉCNICAS GENÓMICAS Y PROTEÓMICAS”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

GEMA CARRASCO DÍAZ

DIRECTOR: DRA. SYLVIA VALDEZATE RAMOS

Madrid, 2021



Memoria presentada en la Facultad de Farmacia
de la Universidad Complutense de Madrid
Por Dña. Gema Carrasco Díaz
para la obtención del grado de doctor

Directora

Dr. Sylvia Valdezate Ramos

Laboratorio de Referencia en Investigación en Taxonomía Bacteriana
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III

Sylvia Valdezate Ramos, Científico Titular del Organismo Público de Investigación del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III,

Por la presente certifica que la memoria titulada “**Identificación de aislamientos clínicos y ambientales de *Nocardia* spp. mediante técnicas genómicas y proteómicas**”, ha sido realizada bajo su dirección por la doctoranda Gema Carrasco Díaz en el Laboratorio de Taxonomía, del Área de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, y estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 3 de febrero de 2021

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by the name 'Valdezate' written in a cursive script.

Dr. Sylvia Valdezate Ramos



Por Ana y por todas nosotras

AGRADECIMIENTOS

Esta es la sección de toda la tesis en la que más tiempo llevo pensando, porque tengo mucho que agradecer. Desde que empecé a trabajar en el Instituto de Salud Carlos III no he dejado de recibir ayuda, amistad, cariño y apoyo. La tesis pretende abarcar 10 objetivos, alcanza 10 conclusiones, y también son más de 10 años compartiendo experiencias, con sus alegrías y tristezas, creciendo junta/os, y trabajando con personas que son para mí un ejemplo de vida.

A Sylvia, por darme esta oportunidad, de aprender, de superarme, de valorar el esfuerzo, y, sobre todo, por ser la gran luchadora a la que me encanta tener de referente. Sabes que todo esto no hubiera salido adelante sin tus desvelos y tu abnegada dedicación. No hay palabras para agradecer tu completa disposición, tanto a nivel profesional como personal.

A Juan, gran poeta, maestro, músico y microbiólogo. Gracias por enriquecer mi vida con tus anécdotas y conocimientos, no cambies.

A Pilar, Mari Jose, Noe, Montse, Virgi, Silvia y todo/as la/os grandes compañera/os y amigas/os que he tenido el placer de conocer, que me han arropado y “soportado” todos estos años. El camino ha sido un placer a vuestro lado.

Presentar este trabajo en tiempos de pandemia me da la oportunidad de agradecer al personal sanitario y a la sanidad pública en particular su entrega y dedicación.

A mi madre, a mi familia y amigos, y a los que ya no están, *Sit tibi terra levis*, que han forjado mi carácter y mis recuerdos

A Dani, parte de esto es mérito tuyo, con tu apoyo he logrado las mejores cosas de mi vida.

A Ana, la pequeña presencia que consigue sacar lo peor y lo mejor de mí. La luz que me guía. Tú eres lo más importante.



El amor es el único camino

INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	17
1. El género <i>Nocardia</i>	19
1.1 Antecedentes históricos	19
1.2 Clasificación taxonómica	20
1.3 Características morfológicas y de crecimiento	26
1.4 Hábitat natural	28
2 Patogenia de <i>Nocardia</i> spp.	29
2.1 Mecanismos de patogenicidad	29
2.2 Manifestaciones clínicas	34
2.2.1. Infecciones del tracto respiratorio	36
2.2.2. Bacteriemia y afectación del Sistema Nervioso Central	38
2.2.3. Infecciones cutáneas	39
2.2.4. Otras infecciones por <i>Nocardia</i> spp.	41
2.2.5 Infecciones por <i>Nocardia</i> spp. en animales	42
2.3 Factores de riesgo	43
2.4 Tratamiento antimicrobiano	44
3 Epidemiología del género <i>Nocardia</i>	47
3.1 Prevalencia de la nocardiosis en humanos	47
3.2 Distribución de las especies de <i>Nocardia</i> spp. productoras	

	de nocardiosis en humanos	49
4	Identificación de especies del género <i>Nocardia</i>	51
4.1	Pruebas bioquímicas	51
4.2	Patrón de sensibilidad a antimicrobianos	52
4.3	Técnicas genotípicas en la identificación de especies	53
	4.3.1 Hibridación con sonda marcada	54
	4.3.2 Ribotipificación	54
	4.3.3 PCR-RFLP	54
	4.3.4 Secuenciación de dianas de uso taxonómico	55
	4.3.3.1 Análisis y secuenciación del genARN _r 16S o gen <i>rrs</i>	55
	4.3.2 Análisis y secuenciación del gen <i>gyrB</i>	58
	4.3.3.3 PRA y secuenciación del gen <i>hsp65</i>	61
	4.3.3.4 Análisis y secuenciación del gen <i>rpoB</i>	61
	4.3.3.5 Análisis y secuenciación del gen <i>secA1</i>	62
	4.3.5 Empleo del esquema MLSA para la identificación de especies de <i>Nocardia</i>	63
4.4	Técnicas proteómicas	65
4.5	Técnicas de Secuenciación Masiva	68
5	Susceptibilidad y resistencia antimicrobiana en <i>Nocardia</i> spp.	69
5.1	Sensibilidad antimicrobiana del género <i>Nocardia</i>	69
5.2	Determinación de la sensibilidad antimicrobiana	70
5.3	Sensibilidad a antimicrobianos de las especies prevalentes en España	71
5.4	Resistencias descritas a estos antibióticos	73

6.	Síntesis de compuestos bioactivos en <i>Nocardia</i> spp.	75
7	Aplicación de la secuenciación masiva con fines taxonómicos en cepas de <i>Nocardia</i> spp.	79
7.1	Fundamento	79
7.2	Etapas del proceso	80
7.3	Plataformas disponibles	85
7.4	Aplicaciones	89
	7.4.1 Identificación de especies mediante WGS	89
	7.4.2. Descripción de nuevas especies	96
	7.4.3 Estudio de las relaciones filogenéticas	96
	7.4.4 Identificación de estructuras	89
7.5	Aplicaciones más recientes en el género <i>Nocardia</i>	99
7.6	Perspectivas futuras	101
	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	105
	PUBLICACIONES	
1.	Artículo 1	113
1.1	Derechos de autoría	115
1.2	“Identification, typing and phylogenetic relationships of the main clinical <i>Nocardia</i> species in Spain according to their <i>gyrB</i> and <i>rpoB</i> genes”	117
1.3	Material suplementario	125
2.	Artículo 2	129
2.1	Derechos de autoría	131
2.2	“ <i>gyrB</i> as a tool for identifying <i>Nocardia</i> species and exploring their phylogeny”	133
3.	Artículo 3	139
3.1	Derechos de autoría	141

3.2	“Traumatic endophthalmitis caused by <i>Nocardia kruczakiae</i> in a patient with traumatic eye injury”	143
4.	Artículo 4	147
4.1	Derechos de autoría	149
4.2	“Shortcomings of the commercial MALDI-TOF MS database and use of MLSA as an arbiter in the identification of <i>Nocardia</i> species”	151
4.3	Material suplementario	159
5.	Artículo 5	165
5.1	Derechos de autoría	167
5.2	“First Draft Genome Sequence of a Clinical Strain of <i>Nocardia cerradoensis</i> ”	169
6.	Artículo 6	171
6.1	Derechos de autoría	173
6.2	“Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibilities of <i>Nocardia</i> Species Isolated from the Soil; A Comparison with Species Isolated from Humans”	175
6.3	Material suplementario	197
DISCUSIÓN		205
BIBLIOGRAFÍA		219
CONCLUSIONES		245
ANEXOS		253
	Anexo I	255
	Anexo II	261
	Anexo III	263
	Anexo IV	272
	Anexo V	275
	Anexo VI	277
	Anexo VII	279

Las imágenes ilustrativas de *Nocardia* spp. han sido tomadas por Noelia Garrido y Gema Carrasco

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNr 16S: ARN ribosomal 16S

AS: Medio de crecimiento agar sangre Columbia

BAL: Lavado broncoalveolar

BAS: Aspirado broncoalveolar

BCYE: Medio de crecimiento con extracto de levadura y carbón vegetal (*Buffered Charcoal Yeast Extract*)

DHI: Agar infusión cerebro corazón

CLSI: Instituto de normas clínicas y de laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DDH: Hibridación DNA-DNA

EcoRI: Enzima de restricción tipo 2 de *Escherichia coli*

G+C: Guanina más citosina

gyrB: Subunidad beta de la enzima DNA girasa

hsp65: proteína de choque térmico de 65 kilodaltons (heat shock protein 65-KDa)

LPSN: Lista de nombres de procariotas con base en la nomenclatura (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura*)

MALDI-TOF: Espectrometría de masas asistida por matriz con desorción/ionización por láser y con analizador de tiempo de vuelo (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Espectroscopy)

MLST: Tipificación por secuenciación de múltiples loci (*Multilocus Sequence Typing*)

nt: nucleótido

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR-RFLP: Reacción en cadena de la polimerasa Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
(*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*)

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

PMN: Macrófagos polimorfonucleares

pH: Potencial de hidrógeno

PRA: Análisis de restricción por PCR (*PCR Restriction Analysis*)

rpoB: Subunidad beta de la enzima RNA polimerasa

rpoD: Subunidad delta de la enzima RNA polimerasa

secA: subunidad A de la proteína traslocasa

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*)

sodA: Subunidad A de la enzima superóxido dismutasa

sodC: Subunidad C de la enzima superóxido dismutasa

sp.: Especie

spp. Especies

TMP-SMX: Trimetoprim-Sulfametoxazol

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

WGS: Secuenciación del genoma completo (*Whole genome sequence*)

RESUMEN



IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DE *Nocardia* spp. MEDIANTE TÉCNICAS GENÓMICAS Y PROTEÓMICAS

El género *Nocardia* se ubica dentro del orden Corynebacteriales, junto con *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, y son bacilos Gram-positivo ramificados con alto contenido en G+C. Comprende unas 200 especies de amplia distribución ambiental que crecen lentamente en condiciones de aerobiosis como colonias separadas y con distintas morfologías, produciendo micelios primarios que se pueden fragmentar en hifas con forma cocoide. Son responsables de infecciones oportunistas en humanos, principalmente en pacientes inmunodeprimidos, con diabetes o neoplasias, inmunosenescentes, trasplantados de órganos sólidos, o en tratamiento con medicamentos inmunosupresores o corticosteroides. Afecta principalmente a los pulmones y tejido cutáneo y subcutáneo, pero puede diseminarse hasta el Sistema Nervioso Central, ojos, y otras regiones. Esta capacidad de diseminación, la presencia de abscesos y granulomas, las recaídas y las infecciones crónicas pueden hacer de su tratamiento un desafío. Además, al igual que otras Actinobacterias, posee una alta capacidad biosintética, lo que ha despertado el interés de la industria farmacéutica.

Desde la descripción de este género, la clasificación taxonómica de *Nocardia* spp. siempre ha sido un reto por la presencia de complejos en una misma especie o de especies próximas, produciéndose la reasignación y/o descripción de nuevas especies mediante la identificación por técnicas genéticas, genómicas y proteómicas. Esta tesis está compuesta por seis publicaciones en las que se aborda la identificación y tipificación de diferentes especies del género *Nocardia* mediante la aplicación de dianas moleculares como el gen 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S), la subunidad beta de la topoisomerasa II (*gyrB*) y de la ARN polimerasa/ADN dependiente (*rpoB*), mediante secuenciación del genoma completo y de la huella peptídica por espectroscopía de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry-Time of flight*).

Inicialmente se estudió la distribución de las diferentes especies productoras de infecciones clínicas en nuestro país. De las cuatro especies más prevalentes (*N. cyriacigeorgica*, 24,5%; *N. farcinica*, 13,6%; *N. abscessus*, 15,9%; y el complejo *N. nova*, 13%) se seleccionaron 119 cepas para el primer artículo. De ellas se analizó su diversidad inter- e intraespecie empleando los genes conservados (ARNr 16S, *gyrB* y *rpoB*). Se observó una completa concordancia en la identificación por *gyrB* y ARNr 16S y, a excepción de las cepas de *N. farcinica*, también un alto número de SNPs, tanto en *gyrB* como en *rpoB*, lo que indica la gran diversidad existente en estas cepas clínicas. Además, el análisis de la proteína GyrB permitió diferenciar entre dos especies muy cercanas filogenéticamente, *N. abscessus* y *N. asiática* por el motivo en la posición ¹⁰⁹Ala [GCC] -¹¹⁰Ala [GCG], y la diferenciación de las especies del complejo *N. nova* por las variaciones en el motivo ¹²⁶AAPEH.

En el segundo artículo se confirmó la utilidad taxonómica de *gyrB* en especies de media (n=40; *N. carnea*, *N. transvalensis*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*) y baja prevalencia (n=35, 22 especies), encontrando un gradiente de diversidad para este gen y la proteína GyrB, alto para *N. carnea* y *N. transvalensis*, medio para *N. brasiliensis* y bajo para *N. otitidiscaviarum*. En el grupo de especies poco comunes (n=35) se obtuvo la misma identificación por ARNr 16S y *gyrB* en el 60% de las cepas.

La aplicación práctica de estos hallazgos se mostró en el tercer artículo con la identificación mediante *gyrB* y *rpoB* de una cepa de *Nocardia kruczakiae*, descrita por primera vez como responsable de un caso de endoftalmítis, una especie filogenéticamente muy cercana a *Nocardia africana*, *Nocardia nova* y *Nocardia veterana*.

Dada la introducción de la plataforma MALDI-TOF MS en la determinación clínica de rutina, se estudió en el cuarto artículo su utilidad para identificar las cepas de *Nocardia* spp. con distinta prevalencia en España. Se observó un 76%, 45% y 9,1% de concordancia en la identificación a nivel de especie por ARNr 16S y MALDI-TOF MS en las especies de prevalencia alta, media y baja, respectivamente. Estas son cifras insuficientes, debido al escaso número de espectros disponible en la base de datos comercial de Bruker® en ese momento. Para la asignación definitiva de especie se tomó como elemento decisor el esquema tetragénico *multilocus sequence analysis*, MLSA (*gyrB*-ARNr 16S-*secA1-hsp65*), que confirmó la limitada utilidad de MALDI-TOF para identificar especies de media y baja prevalencia en ausencia de un mayor número de espectros de estas especies.

Algunas de las limitaciones de las técnicas anteriores se han visto superadas por la secuenciación del genoma completo, por ello en el quinto artículo se secuenció por primera vez el genoma de una cepa clínica de *Nocardia cerradoensis*, descrita previamente como una especie emergente. Se obtuvo un genoma con una longitud de 8.193.765 pb, contenido de G+C de 68,16%, 8.406 genes y un profago intacto.

Dado el origen ambiental del género *Nocardia*, esta tesis se completa con la aplicación de las técnicas genéticas y genómicas (ARNr 16S, *gyrB*, MLSA, sensibilidad antibiótica y secuenciación masiva) a 38 cepas procedentes del suelo de 7 municipios del estado de Lara, Venezuela. Se identificaron siete especies, siendo la especie mayoritaria *N. cyriacigeorgica* (72%). Su comparación con una población clínica demostró la menor variabilidad de las cepas ambientales. Los hallazgos taxonómicos obtenidos tras la secuenciación del genoma completo de cuatro cepas de suelo agrupadas en un clúster específico según *gyrB*, ofrecen unos valores para ANI (*Average Nucleotide Identity*; ~87,7%) AAI-profiler (*Average Amino Acid Identity*; ~75%) DDH

estimado (*Digital DNA-DNA hybridization*; 31,6%) y 1,5% de diferencia en el contenido en G + C que sugieren la existencia de una nueva especie o subespecie (*Nocardia venezuelensis*), próxima a *N. cyriaci-georgica*.

En conclusión, el estudio de *gyrB* (individualmente o combinado con *rpoB*) ofrece un método sencillo para identificar las especies de *Nocardia* y es útil en la determinación de la diversidad intraespecie, complementando el estudio de la secuencia completa de ARNr 16S como herramienta taxonómica. Por otro lado, la identificación por MALDI-TOF sólo ofrece mejoras para especies frecuentes y de fácil resolución taxonómica, mientras que la secuenciación masiva conduce a una identificación y filogenia más fiable y exhaustiva, completando el estudio con la exploración de genes que condicionan su resistencia, virulencia y capacidad biosintética.

SUMMARY



IDENTIFICATION OF CLINICAL AND ENVIRONMENTAL *Nocardia* spp. STRAINS THROUGH GENOMIC AND PROTEOMIC TECHNIQUES

The genus *Nocardia* is located within the order Corynebacteriales, together with *Corynebacterium* and *Mycobacterium*, and they are Gram-positive branched bacilli with a high content of G+C. It comprises about 200 species of wide environmental distribution that grow slowly under aerobic conditions as separate colonies with different morphologies, producing primary mycelia that can be fragmented into hyphae with a coccoid shape. They are responsible for opportunistic infections in humans, mainly in immunosuppressed patients, with diabetes or neoplasms, immunosenescent, solid organ transplants, or in treatment with immunosuppressive drugs or corticosteroids. It mainly affects the lungs and cutaneous and subcutaneous tissues, but can spread to the Central Nervous System, the eyes, and other regions. This ability to spread, the presence of abscesses and granulomas, relapses, becoming chronic infection can make treatment challenging. In addition, like other Actinobacteria, it has a high biosynthetic capacity, which has aroused the interest of the pharmaceutical industry.

From the description of this genus, the taxonomic classification of *Nocardia* spp. has always been a challenge due to the presence of complexes in the same or neighboring species, the reassignment of species and the description of new species through identification by genetic, genomic and proteomic techniques. This thesis is made up of six publications that report the identification and typing of different species of the genus *Nocardia* through the application of molecular targets such as the 16S gene of ribosomal RNA (16S rRNA), the DNA gyrase subunit B (*gyrB*) and the DNA-directed RNA polymerase subunit beta (*rpoB*), by sequencing the whole genome, and the peptide fingerprint applying MALDI-TOF mass spectroscopy (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization-Time of flight).

Initially, the distribution of the different species causative of clinical infections in our country was studied. Of the four most prevalent species (*N. cyriacigeorgica*, 24.5%; *N. farcinica*, 13.6%; *N. abscessus*, 15.9%; and the *N. nova* complex, 13%), 119 strains were selected for the first article. Their inter- and intraspecies diversity was analyzed using the conserved genes (16S rRNA, *gyrB* and *rpoB*). Complete concordance was observed in the identification by *gyrB* and 16S rRNA and, except for the *N. farcinica* strains, also a high number of SNPs, both in *gyrB* and *rpoB* genes, which indicates the great diversity existing in these clinical strains. Furthermore, it was possible to differentiate between two phylogenetically very close species, *N. abscessus* and *N. asiatica* by the analysis of the GyrB protein, due to the motif at position ¹⁰⁹Ala [GCC] -¹¹⁰Ala [GCG], and the differentiation of the species within the *N. nova* complex as a result of different variations in the motif ¹²⁶AAAPEH.

In the second article, the taxonomic utility of *gyrB* was confirmed in *Nocardia* strains of medium (n = 40; *N. carnea*, *N. transvalensis*, *N. brasiliensis* and *N. otititidiscaviarum*) and low prevalence species (n = 35, 22 species).

Subsequently, a diversity gradient for this gene and the GyrB protein was observed, high for *N. carnea* and *N. transvalensis*, medium for *N. brasiliensis* and low for *N. otitidiscaviarum*. In the low prevalence group (n = 35), the same identification was obtained by 16S rRNA and *gyrB* in 60% of the strains.

The practical consequence of these findings was shown in the third article with the identification by *gyrB* and *rpoB* of a *Nocardia kruczakiae* strain, described for the first time as responsible for endophthalmitis, a species phylogenetically near to *Nocardia africana*, *Nocardia nova* and *Nocardia veterana*.

Given the introduction of the MALDI-TOF MS platform in routine clinical determination, in the fourth article its usefulness to identify *Nocardia* spp. strains with different prevalence in Spain was studied. In the identification at the species level by 16S rRNA and MALDI-TOF MS a 76%, 45% and 9.1% concordance was obtained in the high, medium and low prevalence species, respectively. These were low values due to the scarce number of spectra available in the Bruker® commercial database at that time. For the definitive species assignment, the tetragenomic multilocus sequence analysis scheme, MLSA (*gyrB*-16S rRNA-*secA1-hsp65*), was taken as an arbiter, which confirmed the limited usefulness of MALDI-TOF to identify species of medium and low prevalence in the absence of a greater number of spectra of these species.

The limitations of these techniques have been mainly overcome by the whole genome sequencing, for this reason in the fifth article the genome of a clinical strain of *Nocardia cerradoensis*, previously described as an emerging species, was sequenced for the first time. It resulted in a genome with a length of 8,193,765 bp, a G+C content of 68.16%, 8,406 genes and an intact prophage.

Due to the environmental origin of the genus *Nocardia*, this thesis was concluded in the sixth article with the application of genetic and genomic techniques (16S rRNA, *gyrB*, MLSA, antibiotic susceptibility and whole genome sequencing) to 38 strains from the soil of seven municipalities in the state of Lara, Venezuela. Seven species were identified, being the most common species *N. cyriacigeorgica* (72%). Their comparison with a clinical population showed the least variability of the environmental strains. The taxonomic findings obtained after sequencing the complete genome of four soil strains, grouped in a specific cluster according to the *gyrB* gene, offered values for ANI (Average Nucleotide Identity, ~ 87.7%), AAI-profiler (Average Amino Acid Identity, ~ 75 %), estimated DDH (Digital DNA-DNA hybridization, 31.6%) and 1.5% difference in the G+C content, that suggest the existence of a new species or subspecies (*Nocardia venezuelensis*), next to *N. cyriacigeorgica*.

In conclusion, the study of the *gyrB* gene (individually or also combined with *rpoB*) offers a simple method to identify *Nocardia* species and is useful in the determination of intraspecies diversity, complementing the study of the

complete 16S rRNA sequence as a taxonomic tool. On the other hand, identification by MALDI-TOF only offers improvements for the most prevalent species with easy taxonomic resolution. Even though, whole genome sequencing leads to a more reliable and exhaustive identification and phylogeny, improving the study with the exploration of resistance, virulence and biosynthetic genes.

INTRODUCCIÓN



1. El género *Nocardia*

1.1 Antecedentes históricos

En 1888 el veterinario francés Edmond Nocard describió el primer aislamiento de *Nocardia* sp. durante el estudio de un caso de muermo bovino, *farcy bovine*, en la isla de Guadalupe (Antillas francesas). Un año después, Vittore Trevisan lo nombró como *Nocardia farcinica* [Goodfellow&Maldonado, 2012].

En 1891 Hans Eppinger aisló una bacteria Gram positiva, aerobia y acido-alcohol resistente en un paciente con síndrome pseudotuberculoso y absceso cerebral. Se observó que el microorganismo crecía en medios de cultivo como colonias pequeñas y con forma de estrella. En un principio fue descrita como *Cladothrix asteroides* y después pasó a llamarse *Nocardia asteroides* [Eppinger, 1891].

En 1954, *N. farcinica* pasó a considerarse la especie tipo del género *Nocardia* y ese primer aislamiento nombrado por Trevisan fue enviado a dos colecciones de cultivos (ATCC 3318 y NCTC 4524), como la cepa tipo de la mencionada especie. Más tarde, por pruebas fenotípicas se observaron discrepancias entre ambos ejemplares: la cepa enviada a la *National Collection of Type Cultures*, NCTC, se identificó como *Mycobacterium* NCTC 4524 y la enviada a la *American Type Culture Collection* como *Nocardia* ATCC 3318. Como el muermo bobino fue erradicado en la isla de Guadalupe no fue posible comprobar cuál de ellas correspondía a la cepa original descrita por Nocard de 1888 [Luo, 2014].

Cuando Ruth Gordon comparó las cepas *Nocardia* ATCC 3318 de Trevisan y *N. asteroides* de Eppinger por métodos fenotípicos no encontró diferencias. Aunque el nombre de *N. farcinica* tenía más antigüedad, debido a la falta de similitud entre las cepas ATCC 3318 y NCTC 4524, se propuso al “Código Internacional de Nomenclatura en Bacterias y Virus” que se mantuviera el nombre de *N. asteroides* como *nomen conservandum* para ambas cepas, y la cepa *N. asteroides* ATCC 19247 pasó a ser considerada como la cepa tipo para el género *Nocardia* [Gordon&Mihm, 1962].

Posteriores estudios realizados por Tsukamura en 1969 demostraron que las cepas *Nocardia* ATCC 3318 y *N. asteroides* ATCC 19247 no coincidían en todas sus características bioquímicas e inmunológicas, por lo que la Comisión del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática renombró a *Nocardia* ATCC 3318 como *N. farcinica*, por similitud al primer aislamiento de Nocard, y por tanto volvió a ser considerada como la cepa tipo de este género [Tsukamura, 1969].

1.2 Clasificación taxonómica

El contenido de guanina más citosina (G+C) de los ácidos nucleicos de las especies bacterianas es característico del genoma de cada microorganismo, constituyendo un criterio de clasificación. Ambas bases nitrogenadas se encuentran conectadas dentro de la cadena de ADN mediante tres puentes de nitrógeno, a diferencia de las bases adenina y timina, donde esta conexión la llevan a cabo únicamente dos puentes de nitrógeno. A mayor porcentaje de G+C, mayor es la unión entre ambas hebras de material genético, siendo más resistente a la desnaturalización por calor. El género *Nocardia* presenta alto contenido en G+C, llegando a oscilar entre 64 y 78 mol%. En base al contenido en G+C, la clasificación bacteriana se organiza en:

Tabla 1 Clasificación de las especies clínicas más relevantes según su contenido en G+C

Gram positivas	Bajo contenido en G+C	<i>P. Staphylococcus, Micrococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Clostridium, ...</i>
	Alto contenido en G+C	<i>Streptomyces, Mycobacterium, Corynebacterium, Nocardia, Frankia, Propionibacterium, ...</i>
Gram negativas	Bajo contenido en G+C	<i>Vibrio, Klebsiella, Salmonella, Shigella, Yersinia, ...</i>
	Alto contenido en G+C	<i>Pseudomonas, Xantomonas, Trateuria, Zoglea, ...</i>

El género *Nocardia* pertenece al grupo de bacterias conocido como CNM, que también incluye *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, del orden Corynebacteriales. Se caracterizan por poseer largas cadenas de ácidos micólicos en su pared bacteriana, que les confiere propiedades de ácido-alcohol resistencia en la tinción de Ziehl-Neelsen y resistencia a la deshidratación. Este grupo incluye tanto cepas de importancia clínica como saprofitos que viven en suelo, agua y ambientes contaminados [Zoropogui, 2013].

La clasificación taxonómica de *Nocardia* spp. es compleja, pues no existe una clasificación oficial, pudiéndose tomar como referencia la empleada en el Manual Bergey's de bacteriología sistemática o en *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN, <https://lpsn.dsmz.de/>). Según LPSN, las especies del género *Nocardia* pertenecen a:

Dominio	•Bacteria
División o filum	•Actinobacteria
Clase	•Actinobacteria
Subclase	•Actinobacteridae
Orden	•Corynebacteriales
Familia	•Nocardioideaceae
Género	• <i>Nocardia</i>

Las actinobacterias muestran diversas morfologías, que van desde cocos (p. ej., *Lapillicoccus* y *Micrococcus*), bacilos cortos (p. ej., *Mycobacterium* y *Tropheryma*), bacilos irregulares (p. ej., *Arcanobacterium* y *Cellulomonas*), bacilos y cocos (p. ej., *Arthrobacter* y *Brevibacterium*), a micelios que se fragmentan en formas cocoides y en forma de bacilo (p. ej., *Nocardia* y *Promicromonospora*). La composición del grupo actinobacterias aparece indicado en la siguiente figura.

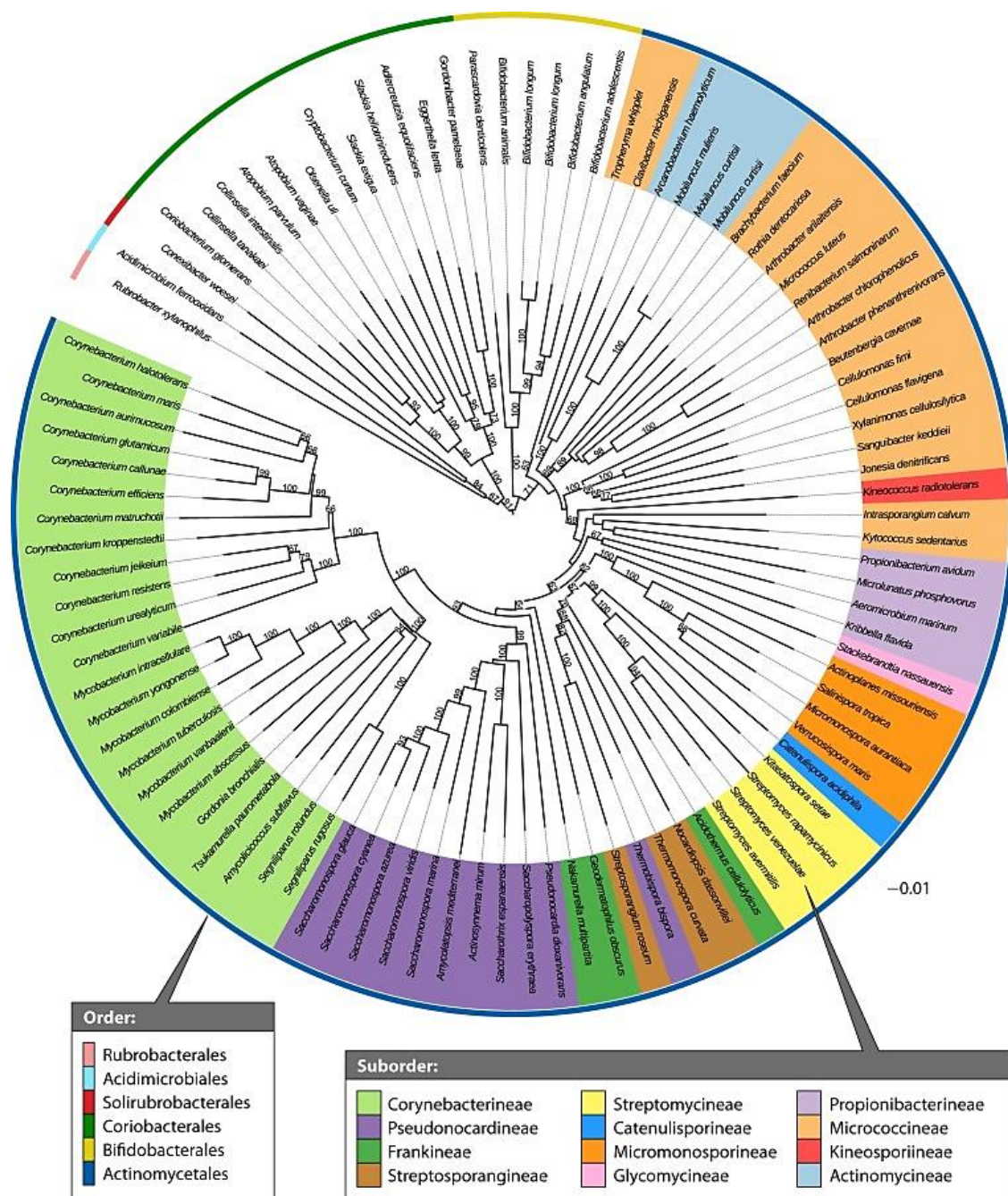


Figura 1 Representación filogenética del filum Actinobacteria a partir del genoma completo. Tomada de Barka y colaboradores [Barka, 2015].

Es de señalar que la denominación de la clase "Actinobacteria" no designa un orden bajo la Regla 27 del Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas de Parker y colaboradores (2015) por lo tanto, este nombre no es válido. Aun así, ha seguido empleándose hasta la actualidad [Nouioi, 2018]. Recientemente se ha recomendado que, de conformidad con la Regla 8 del Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas, Parker y colaboradores 2019, se emplee el nombre para clase "Actinomycetia" que se forma a partir de la raíz del nombre Actinomycetales de Buchanan, 1917, para reemplazar el nombre de clase "Actinobacteria" [Salam, 2020].

La especie es la unidad básica de la diversidad biológica, sin embargo, no existe una descripción universalmente aceptada sobre lo que puede ser esta unidad. Recientemente, se ha sugerido la siguiente definición de especie: “categoría que circunscribe una población monofilética, y genética y fenotípicamente coherente de individuos que pueden ser claramente diferenciados de otras entidades mediante parámetros estandarizados”. Tales parámetros se refieren a los basados en datos genéticos y fenotípicos que se encuentran en las bases de datos interactivas, que permiten comparaciones computerizadas utilizando las herramientas bioinformáticas disponibles [Rosello-Mora, 2019].

Actualmente en *The List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* hay descritas 201 especies de *Nocardia* spp. (consulta a 12/07/2020 <https://lpsn.dsmz.de/>). Este número se va modificando debido a la descripción de nuevas especies y a la retirada de más de una docena de especies que se han encuadrado en otros géneros de bacilos gram-positivos ramificados como *Rhodococcus* o *Gordonia* [Conville, 2018].

En la actualidad 92 de ellas han sido aisladas en humanos, destacando las que producen afectación pulmonar severa y micetomas [Conville, 2016]. De estas, 54 especies han demostrado ser clínicamente relevantes, habiéndose publicado al menos un informe en la prensa científica revisada por pares. En el anexo I se indica la primodescripción de las especies de *Nocardia* descritas.

Los árboles filogenéticos basados en la secuencia de los genes conservados presentes en todas las especies bacterianas muestran algunas especies que están estrechamente relacionadas en función de la similitud de sus secuencias. Se acepta así la existencia de complejos en especies del género *Nocardia*, como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 2 Descripción de diferentes complejos que agrupan a las especies de *Nocardia*. Tomado de Conville y colaboradores [Conville, 2017].

Complejo	Técnica en la que se basa la descripción del complejo	Especies incluidas en el complejo
<i>N. abscessus</i>	MALDI-TOF MS	<i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. pneumoniae</i>
	Secuencia de ARNr 16S de 500 pb	<i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i>
<i>N. brevicatena</i>	Secuencias de ARNr 16S y <i>secA</i>	<i>N. brevicatena</i> , <i>N. paucivorans</i>
	Patrón de sensibilidad antibiótica	
	MALDI-TOF MS	

Complejo	Técnica en la que se basa la descripción del complejo	Especies incluidas en el complejo
<i>N. cyriacigeorgica</i>	Secuencias de ARNr 16S	Varias cepas de <i>N. cyriacigeorgica</i>
<i>N. farcinica</i>	Secuencias de ARNr 16S y <i>secA</i>	<i>N. farcinica</i> , <i>N. kroppenstedtii</i>
<i>N. nova</i>	Secuencias de ARNr 16S y <i>secA</i>	<i>N. africana</i> , <i>N. aobensis</i> , <i>N. cerradoensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. mikamii</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. vermiculata</i> , <i>N. veterana</i>
	Patrón de sensibilidad antibiótica	<i>N. africana</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i>
	MALDI-TOF MS	<i>N. africana</i> , <i>N. aobensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i>
<i>N. otitidiscaviarum</i>	Secuencias de ARNr 16S y <i>hsp65</i>	Varias cepas de <i>N. otitidiscaviarum</i>
<i>N. transvalensis</i>	Secuencias de ARNr 16S y <i>secA</i>	<i>N. blacklokliae</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. wallacei</i>
	Patrón de sensibilidad antibiótica	
	MALDI-TOF MS	

La clasificación de bacterias y arqueas está actualmente basada en la información genética y fenotípica y está restringido principalmente a cepas cultivadas [Yarza, 2014]. La secuenciación de gen ARNr 16S es el método estándar de oro para la identificación molecular de *Nocardia* spp. [Gnanam, 2020].

A continuación, en base a la secuencia de ARNr 16S vemos la relación filogenética existente entre las diferentes especies de *Nocardia* spp. más frecuentemente asociadas a casos clínicos.

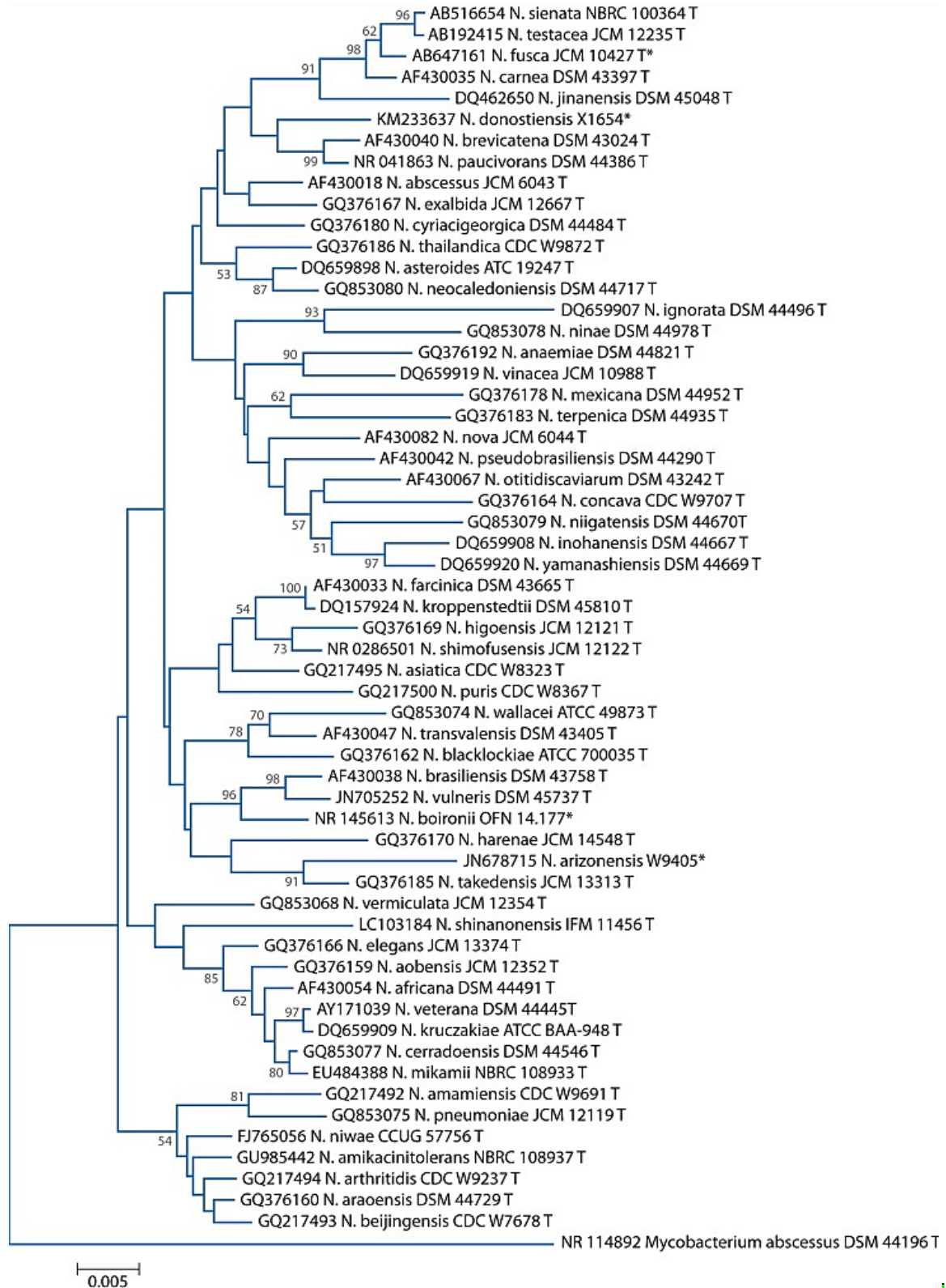


Figura 2 Alineamiento de *Nocardia* spp. basado en la secuencia de 1.427 pb del gen ARNr 16S. Tomado de Conville y colaboradores [Conville, 2017].

1.3 Características morfológicas y de crecimiento

En una observación microscópica tras tinción a partir de las colonias crecidas en medio de cultivo, los aislamientos del género *Nocardia* aparecen como bacilos o incluso cocos gram-positivos acompañados de alguna hifa, aunque en ocasiones esta tinción no es muy clara y pueden llegar a parecer gram-negativos debido a las peculiaridades de su pared bacteriana. A veces, si se tiñe con colorantes ácido-alcohol resistentes una colonia obtenida de un medio de cultivo, esta pierde sus propiedades de fijación de estos colorantes. En este caso es necesario dar un pase previo a un medio rico en lípidos, como Lowenstein-Jensen [Muricy, 2014].

Cuando la tinción se realiza a partir de una cepa procedente de muestra clínica, las cepas se suelen observar largas pseudohifas formadas por cuentas y asociadas a leucocitos polimorfonucleares o en el interior de macrófagos y células mononucleares. Estas hifas suelen medir entre 0,5-1,2 μm de diámetro. En una observación tras tinción en un frotis directo se pueden apreciar las ramificaciones típicas del organismo rodeado de células inflamatorias [Brown-Elliott, 2006].

Las tinciones más empleadas para la observación microscópica son la tinción de Gram y la tinción ácido-alcohol resistente, tipo Ziehl-Neelsen, Kinyoun y sus modificaciones.

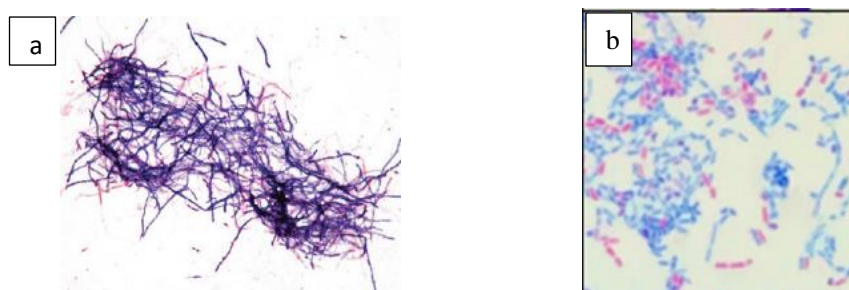
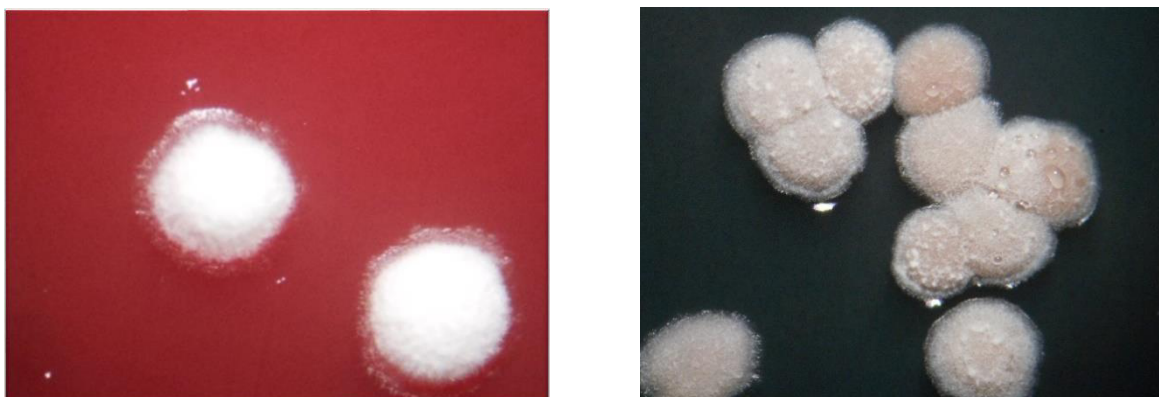


Figura 3a y 3b Morfología de las colonias de *Nocardia* spp a partir de muestra clínica (a) tras tinción de Gram (b) tras tinción de Ziehl-Neelsen en observación microscópica de 100 aumentos. Tomada de Rodríguez-Lozano y colaboradores [Rodríguez-Lozano, 2019].

Las colonias pertenecientes al género *Nocardia* crecen en condiciones de aerobiosis en la mayoría de los medios de cultivo no selectivos para bacterias, micobacterias y hongos. Aparecen como colonias separadas y son de crecimiento lento (48-72 h a 37°C), llegando a requerir en ocasiones un periodo de incubación prolongado (hasta 7 días).

Son bacterias que producen micelios primarios y generalmente se fragmentan en formas de hifas con forma cocoides. *Nocardia* spp. puede mostrar diversas morfologías que van desde lisas hasta rugosas con claro marginado a colonias irregulares. También exhiben varios colores [Dahkal, 2019]. Las hifas aéreas son visibles

con el microscopio y están presentes en casi todas las especies [Zhao, 2020]. El tipo de crecimiento suele ser característico de cada especie. Los medios más empleados para su crecimiento son: Thayer-Martin modificado (agar chocolate con colistina, nistatina y vancomicina), agar tamponado con extracto de levadura de carbón o *Buffered Charcoal-Yeast Extract* (BCYE, agar chocolate con vancomicina, polimixina y anisomicina), medio de Lowenstein Jensen, Agar Ogawa y medios convencionales como el agar Sabouraud dextrosa, agar sangre, agar nutriente y agar infusión cerebro-corazón (BHI) con agentes antibacterianos tales como cloranfenicol, tetraciclinas y estreptomycinina [Fatahi-Bafghi, 2018].



Figuras 4a y 4 Morfología de las colonias de *Nocardia* spp. tras crecimiento en agar sangre y BCYE.

La pared de las bacterias del género *Nocardia* está constituida principalmente por peptidoglicano, pero también contiene ácido meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa. Además, contiene fosfolípidos como difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. De forma similar a las micobacterias, contiene ácidos tuberculosteáricos (ácido 10-metil esteárico) pero, a diferencia de estas, también posee ácidos micólicos de cadena corta (40-60 átomos de carbonos). Esto explica por qué, a pesar de que ambos géneros son ácido-alcohol resistentes, *Nocardia* se describe como ácido-alcohol resistente débil. La cantidad de ácidos micólicos en la pared celular de *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica* y *N. seriolae* ha sido estudiada, y oscila entre 44-64%. Otros componentes de fosfolípidos como el difosfatidil glicerol, fosfatidil etanolamina, fosfatidilinositol y fosfatilinositol manosa, también están presentes en la pared celular [Fatahi-Bafghi, 2018].

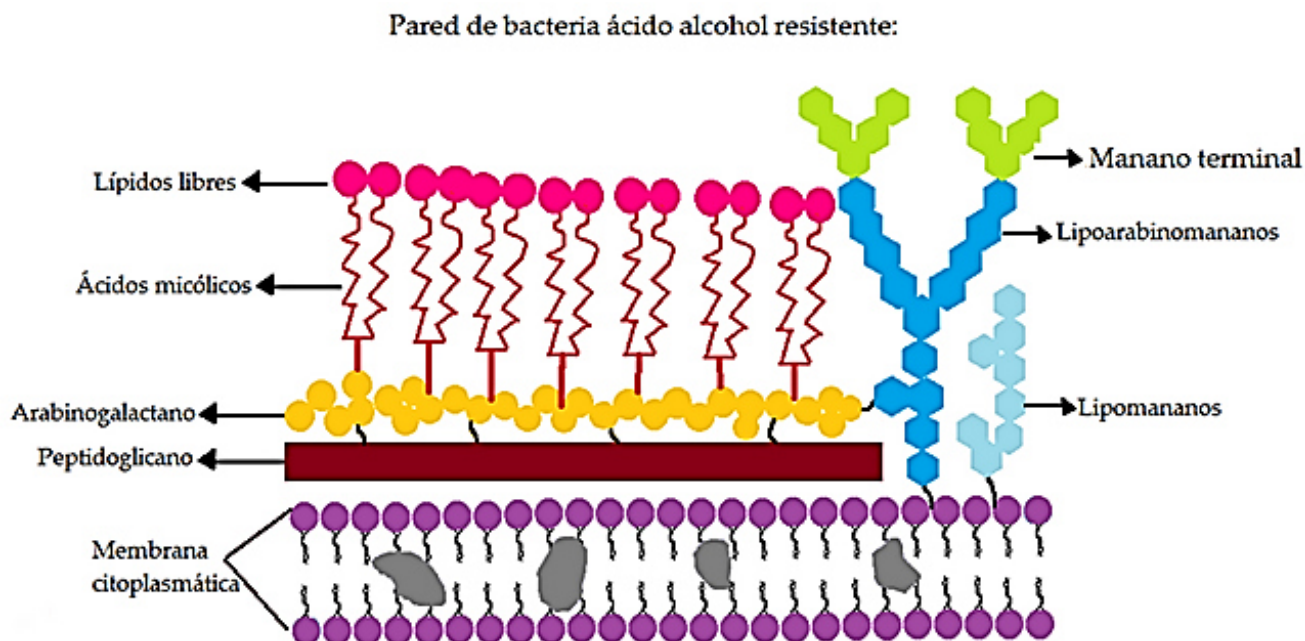


Figura 5 Diagrama de la pared bacteriana de los microorganismos ácido-alcohol resistentes. Tomada de <https://steemit.com/>, adaptada por @osmy07.

1.4 Hábitat natural

Nocardia spp., es un organismo de localización ubicua, capaz de encontrarse en distintos nichos ecológicos, siendo predominante en suelos ricos en materia orgánica, por lo que es considerado un organismo saprofito [Wei, 2019]. Se han encontrado en suelos procedentes de bosques, suelos salinos, asociados a plantas como endofitos, desiertos, y en sedimentos marinos, junto a algas rojas y esponjas marinas [Thawai, 2017], tanto en suelos vírgenes como contaminados con aceite o estiércol [Rodríguez-Nava, 2007; Zhao, 2020]. También, ha sido aislado en aguas, tanto frías como saladas, lagos y sedimentos marinos o plantas de tratamiento de aguas residuales [Yamamura, 2004].

Factores como el pH, el tipo de suelo, el clima, la temperatura y la humedad, entre otros, pueden afectar a la concentración y diversidad de especies de *Nocardia* presentes en las diferentes regiones geográficas [Andalibi, 2015]. Realiza un importante papel en la descomposición de materia vegetal en el suelo, y en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos [Lara-Severino, 216; Rodrigues, 2017], por lo que contribuye al buen estado del medio.

2. Patogenia de *Nocardia* spp.

2.1 Mecanismos de patogenicidad

Los aislamientos de *Nocardia* spp. son considerados organismos de nivel de bioseguridad 2, lo que supone un riesgo moderado para el personal y escasa distribución al medio ambiente. Varias especies de *Nocardia* son patógenos de baja virulencia y ocasionalmente pueden causar enfermedad en personas con el sistema inmunológico comprometido [Dahkal, 2016]. Aunque por el momento no se han publicado casos por infecciones del personal de laboratorio, se debe evitar el contacto mucocutáneo con el agente infeccioso, la inoculación parenteral accidental y la exposición a aerosoles.

Las colonias de *Nocardia* spp. no forman parte de la flora comensal humana ni animal. Es un organismo intracelular opcional que crece dentro de los macrófagos y los tejidos del huésped, jugando el hierro un papel importante en su crecimiento [Fatahi-Bafghi, 2018]. Los factores que condicionan su patogenicidad son muy variados, dependiendo de la especie causante y de las características de cada cepa. Estudios llevados a cabo en ratones infectados con *N. cyriacigeorgica* GUH-2 han desvelado que los mecanismos responsables de la patogenicidad y virulencia de esta bacteria son principalmente la superóxido dismutasa (codificada por los genes *sodA* y *sodC*), la acción de la catalasa (gen *katG*), el factor *cord* o cuerda, la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma y el bloqueo de la acidificación fagosomal.

Un mecanismo patógeno importante para el género *Nocardia* es la resistencia que presentan a la fagocitosis. Se ha demostrado que la bacteria en la etapa filamentaria es 1000 veces más tóxica para los macrófagos de los ratones. *Nocardia* spp. reduce la integración de fagosomas y lisosomas gracias al factor cuerda (*cord factor*) que reduce la actividad de la enzima lisosómica en los macrófagos [Fatahi-Bafghi, 2018]. Este factor cuerda consiste en una trealosa unida a dos moléculas de ácido micólico, presente en la superficie de su pared bacteriana (*trealosa-6,6'-dimicolato*) [Sueoka, 1995].

Además, es capaz de resistir a la oxidación mediada por macrófagos, lo que es debido a la producción de superóxido dismutasa, el aumento en los niveles de enzimas catalasas y la producción de complejos de glucolípidicos de la pared celular. Las cepas de *Nocardia* spp., al utilizar la fosfatasa ácida de la lisozima como fuente de carbono, inhiben la muerte provocada por esta enzima durante la fagocitosis [Fatahi-Bafghi, 2018].

Se ha descrito una forma fenotípicamente distinta de *Nocardia*, llamada “variante de fase L” o variante deficiente de pared celular, que se induce a nivel pulmonar y ha demostrado estar claramente implicada en la patogénesis en modelos animales *in vivo*. Esta forma puede permanecer en el cuerpo del huésped por un

largo período de tiempo, y en ocasiones, si se dan las condiciones propicias, puede reconstruir los componentes de la pared celular y volver a su forma original. Aunque estas formas no se han logrado recuperar de los homogeneizados de los pulmones infectados por *Nocardia* spp. se reconoce que están implicados en la latencia de la enfermedad [Mehta, 2020].

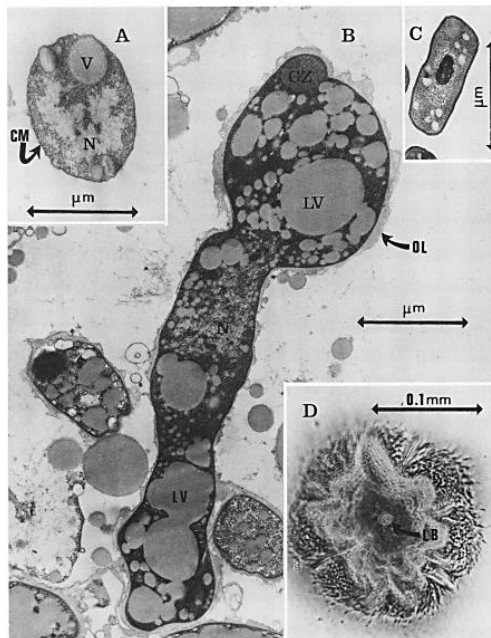


Figura 6 Micrográficas electrónicas de formas L de *N. asteroides* ATCC 10905 cultivadas en agar BYE-L durante 1 semana. (A) No hay evidencia ultraestructural de pared celular residual (flecha). N, región nuclear; V, vacuola; CM, membrana citoplasmática; (B) La porción externa de la pared celular está distribuida irregularmente alrededor de la célula. LV, vacuola lipídica, GZ, zona granular, N, región nuclear, OL, capa externa; (C) Célula normal cultivada durante 1 semana en agar BHI con pared celular intacta; (D) Forma L incubada durante 1 mes en BYE. Tomada de Beaman y colaboradores [Beaman, 1994].

Los mecanismos de resistencia del huésped a estas herramientas por parte de las cepas de *Nocardia* spp. también son complejos. Los polimorfonucleares (PMN) juegan un papel importante por retrasar el crecimiento de la bacteria y así dar tiempo para que la respuesta inmune celular se desarrolle, ya que los macrófagos activados son más capaces de inactivar las cepas de *Nocardia* spp. que los PMN *in vitro*. Sin embargo, los estudios *in vivo* en animales experimentales demuestran que las cepas más virulentas no se eliminan del huésped en al menos 3 h después de una inyección intravenosa, tiempo suficiente para diseminarse a pulmones, bazo, hígado, riñones y cerebro. Parece que la supervivencia del huésped depende de la acción de los linfocitos T funcionales y de la inmunidad celular [Beaman, 1994].

Los macrófagos del hospedador pueden eliminar la mayoría de las bacterias por fagocitosis no selectiva o por mecanismos específicos mediante inmunidad humoral o celular. En los primeros estudios *in vitro* sobre el crecimiento de *Nocardia* spp. en macrófagos cultivados se vio que las colonias son fagocitadas y degradadas lentamente durante los primeros 12 días, pero a los 16 días se observa un aumento significativo.

Por el contrario, los monocitos y las células polimorfonucleares no son capaces de eliminar estas colonias. En estudios con ratones se observó que los especímenes deficientes en células T eran más sensibles a la infección por *Nocardia* spp., llegando a morir tras inoculación transdérmica, frente a la infección localizada que mostraron los individuos con el sistema inmunológico completo [Beaman, 1994].

La proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y el factor nuclear B (NF- B), responsables de la señalización, están involucrados en la regulación celular y juegan un papel crítico en la inmunidad innata al mediar la inducción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-), interleucina-6 (IL-6) e IL-1 [Ji, 2020].

Las infecciones concomitantes en individuos inmunocomprometidos son comunes y pueden incluir coinfección por *Nocardia* spp. con otros patógenos bacterianos, fúngicos y virales [Mehta, 2020]. Debido a esto, algunos genes de virulencia pueden ser adquiridos por transmisión horizontal a partir de especies cercanas, como *Mycobacterium tuberculosis*. Esto se debe a un largo proceso evolutivo condicionado por la relación patógeno-hospedador y a la presión selectiva provocada por la introducción de la terapia antibiótica [Yasuike, 2017]. Los genes descritos en la patogenia de *Nocardia* spp. son los que a continuación se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3 Factores de virulencia descritos para cepas de *N. farcinica*

Gen	Factor de virulencia	Función	Referencia
<i>sodA</i> y <i>sodC</i>	superóxido dismutasa	Impide el mecanismo oxidativo empleado por los fagocitos para eliminar bacterias patógenas pues confiere protección frente al oxígeno en todos los organismos aeróbicos al eliminar el ion superóxido (O_2^-)	Yasuike, 2017
<i>fbpA</i> , <i>fbpB</i> y <i>fbpC</i>	<i>Fibronectin binding protein</i> micoliltransferas	Transportan los ácidos micólicos a su ubicación final en la pared celular	Vera-cabrera, 2013
<i>mce1</i> (A-F), <i>mce2</i> (A-F), <i>mce3</i> (A-F), <i>mce4</i> (A-F), <i>mce5</i> (A-F), <i>mce6</i> (A-F), <i>mce7A</i>	Operón <i>mce</i>	Posibilitan la invasión de las células del hospedador y, por lo tanto, su supervivencia a largo plazo y la proliferación de las bacterias patógenas en las células del huésped	Ji, 2017
<i>yrbE1</i> (A,B), <i>yrbE2</i> (A,B), <i>yrbE3</i> (A,B), <i>yrbE4</i> (A,B), <i>yrbE5</i> (A,B)	Transportador fosfolipídico YrbE	Forma parte del operón <i>mce2</i> , donde los genes <i>mce</i> están agrupados en grupos de seis y cada grupo está precedido por dos copias de un gen <i>yrbE</i> . Las proteínas YrbE y Mce tienen homología con la permeasa y el componente SBP del transportador ABC (<i>ATP binding cassette</i>), respectivamente.	Casali, 2007
<i>nbt</i> (A-F, S, T)	salicilato sintasa	Biosíntesis de nocobactina NA, sideróforo implicado en su virulencia y con actividad citotóxica, por lo tiene actividad terapéutica	Hoshino, 2017 Dhakal, 2019
<i>kat</i> (A, B y G)	catalasa portadora de manganeso	Codifica una proteína que, junto con la superóxido dismutasa reduce la capacidad de defensa de los polimorfonucleares	Zoropogui, 2012
<i>ndk</i>	nucleosido difosfato kinasa	Detiene la maduración fagosómica de los macrófagos para aumentar la supervivencia intracelular del microorganismo y su persistencia	Yasuike, 2017
<i>ptpA</i> y <i>ptpB</i>	proteína tirosina fosfatasa	Misma función en la virulencia que Ndk, sin embargo, PtpB no se considera esencial para la detención de la función del fagosoma	Yasuike, 2017

Gen	Factor de virulencia	Función	Referencia
<i>tlyA</i>	citotoxina/ hemolisina	Actividad hemolítica	Yasuike, 2017
<i>inv</i>	invasina	Adherencia y penetración en las células del huésped	Vera-Cabrera, 2013
<i>ideR</i>	regulador transcripcional	Une el hierro e interactúa con la secuencia específica de las regiones promotoras de los genes regulados por hierro para controlar su transcripción. Estos genes codifican proteínas con diversas funciones, como transportadores, enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos...	Marcela-Rodríguez, 2002
<i>oxyR</i>	regulador transcripcional con detección de peróxido de hidrógeno	Activa la expresión de un regulón de los genes inducibles por peróxido de hidrógeno como <i>katG</i> , <i>gor</i> , <i>hpC</i> , <i>ahpF</i> o <i>grxA</i> . Efecto regulador positivo en la producción de proteínas de superficie que controlan la morfología de las colonias y su capacidad de autoagregación	https://string-db.org/
<i>ahpC</i> y <i>ahpD</i>	alkilhidroperoxido reductasa	Cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos en agua y alcoholes, respectivamente, confiriendo así protección contra el estrés oxidativo	Yasuike, 2017
<i>nar</i> (G, H, I y J) y <i>nirD</i>	subunidad alfa y NAD(P)H de nitrato reductasa	Posibilitan la respiración anaeróbica, por lo que <i>Nocardia</i> spp. puede sobrevivir en condiciones de bajo oxígeno, como en los macrófagos	Wu, 2006

Los estudios del secretoma de actinomicetos patógenos han demostrado que algunas proteínas secretadas, especialmente las proteínas mitocondriales dirigidas, están estrechamente relacionadas con su patogenicidad y puede desempeñar un papel importante en la regulación de la apoptosis celular y la patogénesis bacteriana. Por ejemplo, en *N. seriolae* se ha descrito la secreción de una proteína de unión al ADN similar a histonas (HLP), que están asociadas con el nucleoide y juegan un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura del ADN bacteriano. Estas proteínas se pueden unir también al ADN nuclear en el huésped y regular la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario del huésped, ayudando así a la bacteria a desarrollar una estrategia para evitar la muerte celular y asegurar su supervivencia en el huésped [Wang, 2018].

2.2. Manifestaciones clínicas

Al ser un organismo ambiental, su adquisición más común es por vía respiratoria, seguido de la inoculación transdérmica mediante heridas o traumatismos [Huang, 2019]. También se puede adquirir en el entorno hospitalario en pacientes portadores de catéteres o en infecciones postoperatorias [Al Akhrass, 2011].

La bacteria puede causar tanto infección local como diseminada, con destrucción de tejidos, abscesos, afectación sistémica y lesiones metastásicas, lo que se denomina nocardiosis. Los síntomas de la nocardiosis son inespecíficos y puede ser fiebre, dolor de tórax, aumento de esputo y sudores nocturnos. La radiografía suele mostrar múltiples infiltrados pulmonares. La enfermedad sigue habitualmente un curso subagudo entre 1 y 3 semanas antes de poder ser reconocida. No obstante, en pacientes inmunocomprometidos puede mostrar un curso rápido y progresivo de pocos días [Rodríguez-Nava, 2015].

La estimación poblacional de la tasa de hospitalizaciones reportada oscila entre 0,04 / 100.000 habitantes en el oeste de Europa, 0,39–0,55/100.000 habitantes en España (0,20 si extrapolado a toda la población de España) y 0,33–0,87/100.000 habitantes en Canadá. Es una tasa difícil de establecer, pues hay estudios basados solo en la nocardiosis pulmonar, mientras que otros incluyen nocardiosis

independientemente del lugar de la infección, en algunos casos se diferencia entre infección y colonización y en otros no, hay reingresos por recaídas posteriores, etc. [Ott, 2019].

Se debe diferenciar entre nocardiosis y colonización por *Nocardia* spp. Se define nocardiosis como una infección clínicamente evidente relacionada con el aislamiento de la bacteria, que suele requerir terapia con antibióticos y/o corticoesteroides. Se define colonización como aislamiento de *Nocardia* sin evidencia clínica de enfermedad [Margalit, 2020].

Es considerada una enfermedad severa con cifras de mortalidad como 11,7% en Francia, 21,6% en España, 20,0% en Tailandia y 18,7% en China [Haussaire, 2017]. Tras la afectación pulmonar, la infección puede extenderse al cerebro, entonces la tasa de mortalidad asciende hasta el 50% para los pacientes con afectación del sistema nervioso central [Rouzaud, 2018]. En estos casos los síntomas son dolor de cabeza, debilidad, confusión o incluso convulsiones. La nocardiosis cerebral es poco frecuente, representan solo el 2% de todos los abscesos cerebrales. Su diseminación hematogena desde el lugar de la infección puede provocar infección en prácticamente cualquier parte del cuerpo, pero el cerebro y los tejidos blandos son las áreas más comúnmente afectados. A diferencia de la nocardiosis pulmonar y las infecciones cutáneas, que pueden ser autolimitadas, las lesiones de nocardiosis diseminada progresan, a menos que sean tratadas [Whadwa, 2017].

Las infecciones en la piel pueden ocurrir cuando el suelo contiene cepas de *Nocardia* y llegan al huésped a través de heridas abiertas o cortes. La agricultura o la jardinería sin guantes y ropa protectora aumentan el riesgo de cortes, pinchazos de espinas u otras lesiones menores. En este caso se pueden desarrollar úlceras cutáneas y nódulos, en ocasiones drenantes, que pueden extenderse a lo largo de los ganglios linfáticos (<https://www.cdc.gov/>).

El pronóstico de la nocardiosis es variable. Depende del órgano afectado, la duración, el estado inmunológico de la persona y la gravedad de la infección. La piel y los tejidos blandos tienen un pronóstico mucho mejor en comparación con la infección por nocardiosis diseminada pulmonar y sistémica cuando se administra el tratamiento adecuado. La mayoría de los pacientes con nocardiosis cutánea pueden mejorar con un tratamiento temprano, sin embargo, en pacientes con absceso cerebral, las tasas de recuperación son inferiores al 60% [Rawat, 2020].

2.2.1. Infecciones del tracto respiratorio

El tracto respiratorio es el principal punto de entrada, ocasionando en el 50-70% de los casos compromiso pulmonar, bronquiectasias y otros daños estructurales en los pulmones [Ambrosioni, 2010]. Estas bronquiectasias han sido diagnosticadas especialmente en mujeres [Steinbrink, 2018].

La nocardiosis pulmonar provoca formación de abscesos, acumulación de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), vasculitis, empiema, infecciones fúngicas concomitantes, neumocistis pulmonar, neoplasia e infección pulmonar, similar a los cuadros causados por *Rhodococcus equi*, tuberculosis y estafilococos, y su diferenciación de la nocardiosis pulmonar es fundamental [Fatahi-Bafghi2018].



Figura 7 Nódulo pulmonar causado por *N. asteroides*. Tomado de Gutiérrez Dubous y colaboradores [Gutierrez-Dubous, 2006].

La afectación pulmonar constituye la manifestación clínica más común, suponiendo entre un 60-80% de las nocardiosis diagnosticadas [Rodriguez-Nava, 2015; Ambrosioni, 2010; Tremblay, 2010]. En el caso de España, más del 85% de los casos de nocardiosis cursaron con afectación pulmonar [Valdezate, 2017].

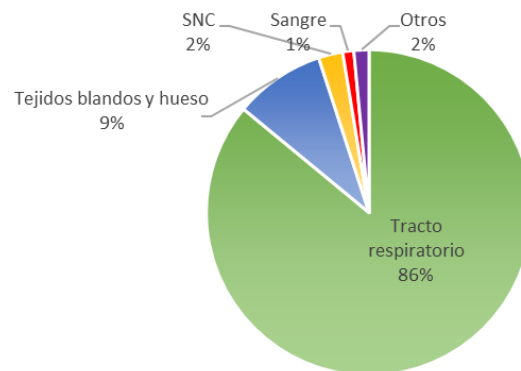


Figura 8 Origen de las cepas de *Nocardia* spp. recibidas en el Centro Nacional de Microbiología entre los años 2005-2014. Tomado de Valdezate y colaboradores [Valdezate, 2017]

En una radiografía de tórax se pueden observar múltiples infiltrados pulmonares que algunas veces se asocian con necrosis [Rodríguez-Nava, 2015]. Si coloniza órganos vecinos causa pericarditis, mediastinitis y síndrome de la vena cava superior. La afectación pleural se da en uno de cada tres pacientes [Wilson, 2012].

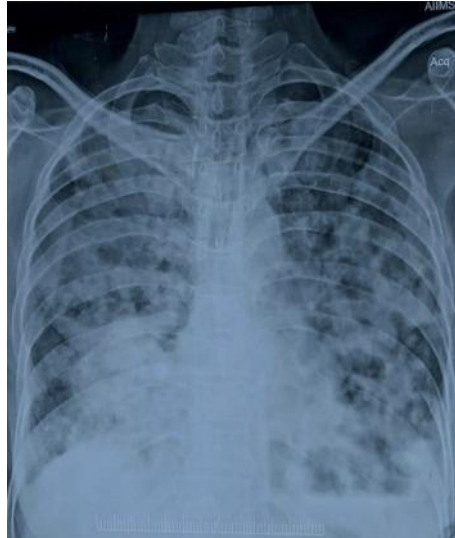


Figura 9 Radiografía de tórax con consolidación bilateral difusa y cavitación. Tomado de Mohanty y colaboradores [Mohanty, 2020]

La nocardiosis pulmonar puede deberse a una afectación por *Nocardia* asociadas o no a otros patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae* y *Candida albicans*, entre otros [Rodríguez-Nava, 2015]. Clínicamente, la neumonía causada por *Nocardia* spp. es indistinguible de la neumonía causada por otros agentes infecciosos, por lo que es infrecuente sospechar que se trate de nocardiosis si se da en un paciente inmunocompetente. Las manifestaciones clínicas son muy similares a las observadas en casos de neumonía por otras etiologías, excepto por la falta de fiebre en más de la mitad de los pacientes descritos. Recientemente, en nuestro país se ha observado que *N. cyriacigeorgica* es la especie más frecuentemente asociada con casos de neumonía, seguida de *N. abscessus* y *N. farcinica* [Ercibengoa, 2020].

2.2.2. Bacteriemia y afectación del Sistema Nervioso Central

Denominada también nocardiosis diseminada. En la mitad de todos los casos de nocardiosis pulmonar, la enfermedad también se localiza fuera de los pulmones, siendo el área más comúnmente afectada el cerebro (hasta un 44% de los casos) [Wilson, 2012], confundiendo en ocasiones con lesiones neoplásicas [Patel, 2019]. La bacteria se disemina por el torrente sanguíneo y se dirige al tejido cerebral por el que tiene particular predilección. Aunque no es lo más común, la mortalidad asociada a abscesos cerebrales causados por *Nocardia* spp. es mayor que la debida a otros agentes causantes de absceso cerebral (31% versus 10%) [Barka, 2015].

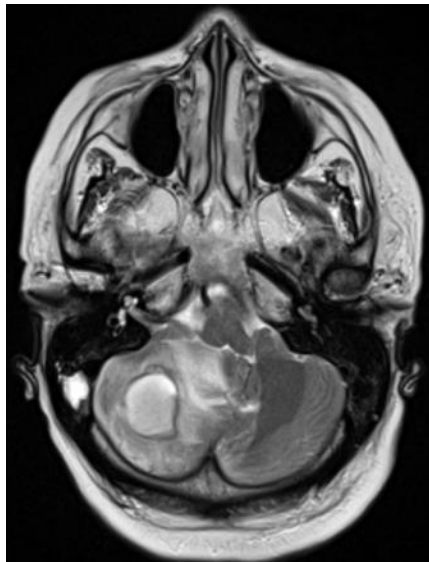


Figura 10 Lesión quística periférica de 3,4 cm del cerebelo derecho causado por *N. farcinica*. Tomado de Patel y colaboradores [Patel, 2019]

Puede manifestarse de diversas formas, incluyendo dolores de cabeza, convulsiones y déficits neurológicos focales. Las infecciones por *Nocardia* spp. suelen presentarse como meningitis o absceso subagudo. Los abscesos cerebrales son típicamente supratentorial (en la parte superior al tentorio, tabique transversal que separa la fosa cerebral de la fosa cerebelosa), a menudo multiloculados, y pueden ser únicos o múltiples. Cuando se producen de forma aislada, el absceso cerebral causado por *Nocardia* se presenta como una lesión en masa lentamente progresiva, con una tasa de mortalidad del 55% en pacientes inmunocomprometidos y del 20% en pacientes inmunocompetentes; estas tasas aumentan al 66% si existen abscesos múltiples [Patel, 2019].

Se está estudiando la posible implicación de cepas del género *Nocardia* en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y en alteraciones del comportamiento, utilizando ratones como modelo animal [Díaz-Corrales, 2004]. Los estudios han proseguido hasta nuestros días [Uhde 2016; Souibgui, 2017], de momento sin resultados concluyentes.

Recientemente se ha desarrollado un estudio multicéntrico en Europa sobre los casos de nocardiosis cerebral secundaria tras trasplante de órgano sólido. El riesgo de desarrollar nocardiosis después de un trasplante varía según el tipo de órgano trasplantado, observándose las tasas de infección más altas después del trasplante de pulmón (0,8%-3,5%) y la más baja después de los trasplantes de hígado y riñón (0,04%-1,2%). Aparece infección en SNC tras trasplante en el 0,04-3,5% de los casos, pero el 43,3% de estos casos de nocardiosis secundaria en SNC no se observaron síntomas neurológicos. *N. farcinica* es el agente causal más común a nivel de SNC [Lebeaux, 2019], siendo responsable esta especie de la mitad de los casos en nuestro país [Valdezate, 2017].

2.2.3. Infecciones cutáneas:

La nocardiosis cutánea y subcutánea primaria generalmente ocurren después de la introducción traumática de cepas de *Nocardia* spp. en la piel mediante punción por una espina, astilla, herida punzante, picadura de garrapata o mosquito, arañazos de animales (gato o conejo), o mordedura de perro. El crecimiento localizado puede progresar lo suficiente como para inducir una respuesta inflamatoria que conduzca a la acumulación de leucocitos polimorfonucleares (PMN), que da como resultado celulitis, pústulas, pioderma, o abscesos localizados. Entonces puede diseminarse desde el sitio primario de inoculación a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos regionales, causando nocardiosis linfocutánea [Beaman, 1994].

A diferencia de otras formas de nocardiosis, la enfermedad cutánea primaria generalmente se desarrolla en huéspedes inmunocompetentes. Presenta similitud con infecciones de tejidos blandos producidas por *S. aureus* o estreptococos, sin embargo, esta forma de nocardiosis generalmente es más suave [Wilson, 2012].

Un micetoma es una infección subcutánea crónica en la cual se presentan tumores donde *Nocardia* spp. se encuentra formando micelios. Es endémico en muchos países tropicales y subtropicales (entre las latitudes 15S y 30N), y la mayoría de los casos se han reportado en Sudán, México e India. Se caracteriza

por la triada de síntomas: masa subcutánea indolora, senos paranasales y descarga de gránulos con el microorganismo [Wang, 2019]. A menudo comienza como un nódulo indoloro que se desarrolla en el sitio de la lesión días o meses después de la inoculación. Este nódulo aumenta de tamaño y puede volverse purulento y necrótico, conduciendo a una inflamación granulomatosa crónica con hinchazón concomitante y agrandamiento de las áreas circundantes. Se producen nódulos secundarios adicionales y múltiples que exudan fluido seroso [Beaman, 1994]. Se trata de una lesión localizada que rara vez se disemina [Chedid, 2007]. El sitio más común de infección son las extremidades inferiores, pero también se ha observado en manos. Otras áreas del cuerpo menos afectadas incluyen brazos, nalgas, hombros, tronco y cuello. Es una enfermedad de curso lento y el tiempo entre la infección inicial y el diagnóstico final puede variar de unos pocos meses a 60 años [Wang, 2019].



Figura. 11 Micetoma primario y su evolución en 6 semanas de tratamiento antibiótico intravenoso combinado. Tomado de Nguyen y colaboradores [Nguyen, 2017]

El principal responsable de esta etiología es la especie *Nocardia brasiliensis*, causante en algunos países de más del 86% de los actinomicetomas diagnosticados [Vera-Cabrera, 2013], aunque también se han descrito micetomas causados por *Nocardia asteroides* y *Nocardia otitidiscaviarum* [Wilson, 2012]. En nuestro país, el 25% de los aislados procedentes de muestras cutáneas pertenecieron a cepas de *N. farcinica* o *N. brasiliensis* [Valdezate, 2017].

2.2.4. Otras infecciones por *Nocardia* spp.:

La bacteriemia por *Nocardia* spp. es un cuadro clínico poco frecuente. Se muestra como una consecuencia secundaria a una infección anterior de origen pulmonar (64% de los casos), cutánea (28%) o de SNC (19%) [Wilson, 2012]. Es importante su diagnóstico debido a la especificidad del manejo de la terapia antimicrobiana y de apoyo requeridas para el tratamiento, y a la mortalidad que ocasiona, con cifras de hasta el 50% en algunos estudios [Williams, 2020].

A pesar de las tasas relativamente bajas de *Nocardia* spp. en sangre, incluso en casos de nocardiosis diseminada y pacientes inmunosuprimidos, los hemocultivos son el método de diagnóstico más importante. En algunos casos, los hemocultivos negativos pueden deberse al tratamiento empírico de pacientes con antimicrobianos, la existencia de bacteriemia concomitante con otros organismos menos fastidiosos, muestreo insuficiente de hemocultivo en pacientes inmunocomprometidos o escaso tiempo de incubación, pues puede llevar hasta 14 días identificar colonias visibles de *Nocardia* en medios sólidos [Williams, 2020].

La mayoría de los casos de nocardiosis extrapulmonar no cutánea ni neurológica afecta a huesos, ojos, corazón, articulaciones y riñones [Beaman, 1994]. Existen numerosos estudios de *Nocardia* spp. como agente etiológico de infecciones oculares, diagnosticándose el primer caso de queratitis por *Nocardia* sp. en 1944. En la mayoría de los casos los pacientes son inmunocompetentes, habiendo adquirido la infección a través de rutas exógenas, por trauma o cirugía ocular [Gnanam, 2020]. Puede causar diferentes tipos de infecciones oculares: conjuntivitis, dacriocistitis (obstrucción de la vía lagrimal por infección), endoftalmitis con reducción de la visibilidad y dolor ocular, granuloma epiescleral, queratitis, y escleritis. En pacientes con infección sistémica por *Nocardia* spp. se puede desarrollar endoftalmitis endógena en el 0,6%-1% de los casos [Fatahi-Bafghi, 2018].

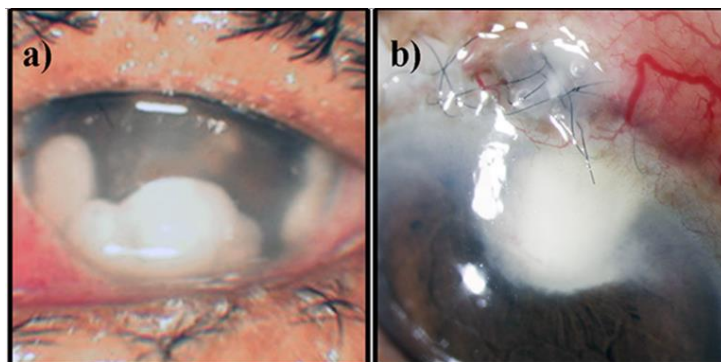


Figura 12 a) y. b) Endoftalmitis causada por *Nocardia* spp. y asociada a sutura con escleritis necrotizante. Tomada de Gnanam y colaboradores [Gnanam, 2020]

En escasas ocasiones se han diagnosticado casos de nocardiosis intestinal. Suele debutar como una peritonitis aguda en pacientes inmunodeprimidos diagnosticada por laparoscopia. [Chedid, 2007]. Aún en menor número se han descrito otras manifestaciones clínicas como septicemia relacionada con el uso de catéter, osteomielitis, peritonitis y endocarditis. Las infecciones en el torrente sanguíneo por afectación de catéteres venosos centrales o asociadas a la vía central son importantes y se deben tener en cuenta para pacientes con cáncer por la posible formación de biofilms en catéteres de poliuretano o silicona [Fatahi-Bafghi, 2018]. En estos casos, se ha comprobado que las soluciones antisépticas que contienen trimetoprim y minociclina erradican las cepas de *Nocardia* spp. de la matriz del biofilm [Al Akhrass, 2011].

2.2.4. Infecciones por *Nocardia* spp. en animales

De entre todas las especies de *Actinomycetales*, el género *Nocardia* es el que causa mayor afectación en animales, principalmente en ganado bovino y otros animales domésticos como gatos [Soto, 2014], perros [Uhde, 2016] y caballos [Bolon, 1989]. También se han descrito casos en animales salvajes como pájaros [Churgin, 2019], zorros [Loupal, 1982], koalas [Wigney, 2006], armadillos [Gezuele, 1972] y monos [Ferrecchia, 2015]. Los modelos murinos han permitido el análisis de los mecanismos involucrados en la relación entre *Nocardia* spp. y su hospedador [Beaman, 1994].

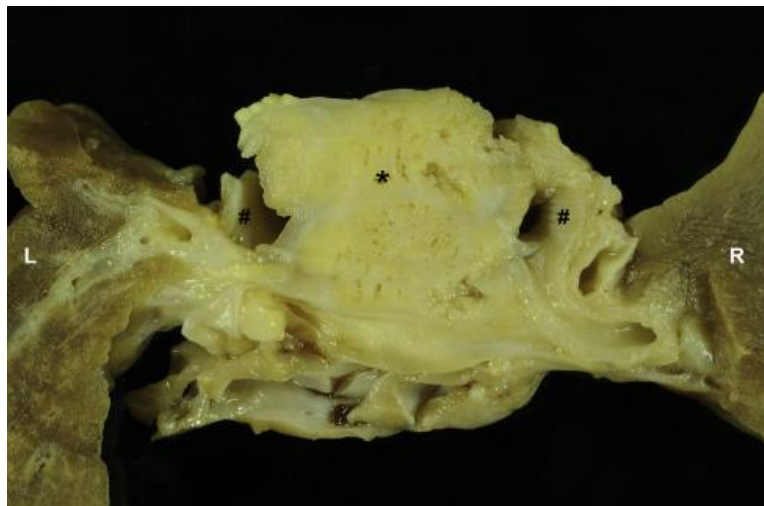


Figure 13 Granuloma en el pulmón de un perro causado por *Nocardia veterana*. Tejido fijado con formalina. Tomado de Uhde y colaboradores [Uhde, 2016]

Se ha asociado con mastitis en vacas lecheras y en cabras, lo que produce una disminución en la producción de leche, ocasionando grandes pérdidas económicas [Chen, 2017]. Se suele advertir entre rebaños lecheros con escasas condiciones higiénicas en el ordeño, causado por la contaminación del suelo que llega a pezuñas y mamas, especialmente en temporadas poco húmedas [Ribeiro, 2008]. Uno de los brotes más destacados tuvo lugar en Canadá en 1989 como consecuencia secundaria del empleo de productos con neomicina para el saneamiento bovino. Afortunadamente, las industrias farmacéuticas detuvieron la producción y distribución de todos los productos con base de neomicina para la higienización del ganado, y los casos han disminuido, a lo que también ha contribuido el aumento de las medidas higiénicas en el tratamiento de los productos lácteos [Dohoo, 1991].

El caso de la infección en peces por *Nocardia seriolae* tiene también gran repercusión económica. En Japón, los peces del género *Seriola* son las especies de acuicultura más producidas y económicamente más ventajosas. La nocardiosis, causada por *N. seriolae* (inicialmente nombrada como *Nocardia kampachi*), es una de las amenazas económicas más graves para estos peces, siendo además capaz de infectar otras especies acuáticas, tanto peces marinos como de agua dulce [Yasuike, 2017]. Es tal el interés que se han llegado a desarrollar vacunas [Hoang, 2020].

2.3. Factores de riesgo

Las especies de *Nocardia* generalmente se consideran oportunistas, causando infecciones principalmente en pacientes inmunocomprometidos (hasta el 80%). Sin embargo, se ha empezado a describir también en pacientes inmunocompetentes llegando a alcanzar en algunos estudios hasta el 60% de los casos [Steinbrink, 2018]. Algunos autores no han encontrado diferencias en el resultado del tratamiento con corticoides entre pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, aunque en otros trabajos se han observado un aumento en la tasa de diseminación de las infecciones y una mayor mortalidad en pacientes inmunocomprometidos [Ercibengoa, 2020].

Entre las enfermedades predisponentes para sufrir nocardiosis pulmonar se encuentran la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (enfisema o bronquitis crónica), asma, sarcoidosis crónica y bronquiectasia. A menudo estas enfermedades (con la excepción de la bronquiectasia) han sido tratadas durante largo plazo con dosis altas de corticosteroides [Brown-Elliot, 2006]. Aunque la fibrosis quística se asocia con complejos trastornos inmunológicos y metabólicos, daño pulmonar, inmunosupresión

relacionada con corticoesteroides o trasplantes, rara vez se aíslan cepas de *Nocardia* spp. en el esputo de pacientes con fibrosis quística y es escaso el número de casos reportados en la literatura [Rodríguez-Nava, 2015].

Cualquier patología que implique disminución de la inmunidad celular mediada por linfocitos T predispone para sufrir nocardiosis. Los linfocitos T desarrollan en la defensa del organismo una doble acción, la acción directa por destrucción de las células infectadas, y la activación de los macrófagos para la eliminación de la bacteria. Actúan junto a los neutrófilos, la primera línea de defensa del sistema inmune, los cuales disminuyen parcialmente el número de colonias de *Nocardia* spp. pero no son capaces de eliminarlas completamente de los tejidos [Luo, 2014]. Pacientes con inmunosupresión sistémica inducida por fármacos (principalmente corticoesteroides) y pacientes con inmunosupresión no inducida por fármacos (enfermedad granulomatosa crónica, alcoholismo crónico, neoplasias hematológicas, trasplantes de órganos, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana), también son más susceptibles a las infecciones pulmonares por *Nocardia* spp. [Brown-Elliott, 2006].

Un reciente estudio europeo multicéntrico concluyó que los cinco factores de riesgo más importantes para la adquisición de nocardiosis tras un trasplante de órganos sólidos son: la edad del paciente, la ingesta de niveles mínimos del inhibidor de calcineurina un mes antes del diagnóstico, el uso de tacrolimus y el uso de corticosteroides en el momento del diagnóstico y la duración de la estancia en la unidad de cuidados intensivos después del trasplante [Lebeaux, 2017].

En pacientes VIH positivos los casos de nocardiosis pueden oscilar entre el 3,4 - 16,7% de los pacientes. Por esto, en personas con VIH y pulmón afectado o compromiso pericárdico, y recuento de células T CD4 + por debajo de 50u/μL, se debe sospechar de nocardiosis [Duggal, 2020].

2.4. Tratamiento antimicrobiano

Los primeros medicamentos empleados en los años 40' contra la nocardiosis fueron sulfadiacina y sulfisoxazol. La posterior introducción de trimetoprim (TMP) en combinación con sulfametoxazol (TMP-SMX, en relación 1:19 trimetoprim-sulfametoxazol) en la década de 1970 mejoró el tratamiento para las infecciones por *Nocardia* spp. [Brown-Elliott, 2012]. Esta combinación de medicamentos, denominada cotrimoxazol, sigue siendo la piedra angular en el tratamiento de la nocardiosis [Williams, 2020], aunque

con controversia, pues cada vez hay más evidencias de la presencia de resistencia a este antibiótico en cepas de *Nocardia* spp. [Uhde, 2010; Larruskain, 2011; Valdezate, 2015].

Otros agentes antimicrobianos utilizados en el tratamiento de las nocardiosis, principalmente en combinación con el cotrimoxazol, son tetraciclinas (minociclina y doxiciclina), rifampicina, aminoglucósidos, carbapenémicos, fluorquinolonas, betalactámicos, macrólidos (claritromicina) y oxazolidinonas [Welsh, 2013]. Para pacientes con enfermedades graves se emplea también amikacina de forma individual, una combinación de amikacina y un betalactámico como ceftriaxona o imipenem, y una combinación de amikacina con linezolid [Hashemi-Shahrak, 2015].

Las principales características del tratamiento antimicrobiano de las nocardiosis en humanos se recopilan en el Anexo II. Los regímenes óptimos para el tratamiento antimicrobiano en los casos de nocardiosis no han sido establecidos oficialmente. Las cepas de *Nocardia* spp. muestran patrones de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* variables por lo que el manejo de las infecciones por *Nocardia* sp. debe ser individualizado [Wilson, 2012]. Debido a su lenta replicación y a su tendencia a la formación de estructuras de resistencia intracelular (formas L), se requiere una terapia antimicrobiana prolongada durante varios meses. Esta terapia debe monitorizada para evaluar la respuesta y controlar la toxicidad del fármaco. La mejoría se percibe a las dos semanas del inicio de la terapia, y se deben controlar posibles resistencias a los antimicrobianos, empleo de dosis apropiada para lograr la concentración sérica *in situ*, o la presencia de abscesos focales [Duggal, 2020].

3. Epidemiología del género *Nocardia*

Como se ha comentado anteriormente, *Nocardia* spp. es un organismo ambiental ubicado en un amplio número y variedad de nichos ecológicos, como suelos en descomposición, aguas contaminadas o terrenos con deposiciones de animales [Brown-Elliot, 2006]. No todas las especies han sido descritas como causantes de infección en humanos y animales [Minero, 2009].

Las tasas de incidencia del aislamiento de *Nocardia* spp. a partir de muestras clínicas ha aumentado en todo el mundo en las últimas décadas, lo que podría estar relacionado con los avances técnicos en el cultivo, los métodos moleculares de identificación y las técnicas diagnósticas, y con el aumento de la población inmunosensible por diferentes causas (edad, trasplante de órgano sólido, tratamiento inmunodepresor, ...) [Hashemi-Shahraki, 2015].

3.1 Prevalencia de la nocardiosis en humanos

Se manifiesta principalmente en adultos y es más frecuente en hombres que en mujeres, debido posiblemente a efectos hormonales, con una relación 3:1. No hay una relación significativa con la edad del paciente, sin embargo, los afectados están, en promedio, en los 40 años [Rawat, 2020]. Sólo un 25% de los casos se han descrito en niños [Kandi, 2015].

No hay evidencia absoluta de la transmisión de persona a persona de *Nocardia*, aunque se han dado casos muy aislados de transmisión nosocomial, infecciones asociadas con implantes quirúrgicos, septicemia asociada a la atención médica y enfermedad pulmonar después de la broncoscopia [Rahdar, 2019] o brotes epidémicos aislados [Hardak, 2012].

La nocardiosis es una enfermedad de afectación mundial. Los datos disponibles sobre la incidencia de nocardiosis son limitados [Duggal, 2020]. Se ha observado una tendencia gradualmente creciente desde la pasada década [Lu, 2018], cuando se reportaron anualmente entre 150-250 casos en Francia [Fatahi-Bafghi, 2018], entre 90-130 en Italia y entre 500-1000 casos en Estados Unidos [Duggal, 2020].

En Canadá, la incidencia anual aumentó de 0,33 a 0,87/100.000 habitantes entre los años 1997 y 2008 [Temblay, 2010]. La incidencia anual en países de América del Sur ha sido, en general, más alta, con 1,8/100.000 habitantes en Colombia y 2/100.000 en Chile, al igual que en Asia, con 1,88/100.000 en Irán, y 1,9/100.000 en China. En Europa estos valores de incidencia oscilan entre 0% en Islandia y 1,9/100.000 en Rumanía [Rahdar, 2019]. La incidencia anual de nocardiosis en Australia es de 2,02 por cada 100.000 habitantes [McGuinness, 2016]. El continente que mostró mayor incidencia fue África, con valores que alcanzan los 4,1 casos/100.000 habitantes en Nigeria [Rahdar, 2019].

En España los estudios de Minero y colaboradores sitúa las tasas de incidencia en 0,39/100.000 habitantes entre 1995-1998 y 0,55/100.000 habitantes entre 2003-2006, con una media de 92 casos nuevos/año [Minero, 2009]. Un estudio posterior, realizado con cepas procedentes de todo el país, muestran una cifra de nocardiosis de 94 casos/año, observándose un incremento de más del 25% entre los periodos 2005-2009 y 2010-2014 [Valdezate, 2017]. En un estudio posterior realizado durante los años 2010 y 2016 en distintas ciudades de Cataluña y País Vasco, el número de casos de nocardiosis pulmonar oscila entre 1-20 casos por hospital y año [Ercibengoa, 2019].

Dado que no es una enfermedad de declaración obligatoria, sus manifestaciones clínico-radiológicas son inespecíficas, la baja sospecha clínica, y el lento crecimiento de patógeno es posible que sea una infección infradiagnosticada en pacientes inmunocompetentes [Wadhwa, 2017].

Las tasas de mortalidad pueden alcanzar valores de hasta 42,8% [Wadhwa, 2017]. En otros estudios estos valores se estiman en 20% y 55% en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, respectivamente [Fatahi-Bafghi, 2018]. Si se produce diseminación del microorganismo, particularmente al sistema nervioso central (SNC), puede ser potencialmente mortal, con tasas de mortalidad de hasta el 85% en individuos inmunocomprometidos [Mehta, 2020], y hasta el 17% en pacientes con nocardiosis tras trasplante de órgano sólido [Majeed, 2018]. La nocardiosis pulmonar alcanzó tasas de mortalidad de 38,2% en nuestro país [Ercibengoa, 2020].

3.2 Distribución de las especies de *Nocardia* spp. productoras de nocardiosis en humanos

La epidemiología de las distintas especies de *Nocardia* asociadas a cuadros clínicos en humanos varían según las áreas geográficas de estudio [Tan, 2020]. En nuestro país, las cuatro especies más prevalentes son *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, *N. abscessus* y el complejo *N. nova* [Valdezate, 2017].

N. cyriacigeorgica

Es la principal especie responsable de los casos de nocardiosis en España, siendo el agente etiológico del 25,3% [Valdezate, 2017] o el 43% [Ercibengoa, 2020] de los casos, según las características del estudio. Se ha descrito también como la especie más frecuente en Irán (27,5%) [Hashemi-Shahraki, 2015] y entre los casos de fibrosis quística en Francia (50% de los casos) [Rodríguez-Nava, 2015]. Aparece en menor proporción en Taiwan (15,9%) [Lai, 2011], Francia (12,9%) [Lebeaux, 2019] y Australia (22,6%) [Tan, 2020]. También fue el principal agente responsable de contaminación de las muestras ambientales (24%) encontradas en un hospital iraní [Rahdar, 2019].

N. farcinica

Es la principal especie responsable de nocardiosis en Japón, con el 26,7% de los casos [Kageyama, 2004], Francia (20,2%) [Lebeaux, 2019], Tailandia (35,4%) [Poonwan, 2005], Bélgica (44%) [Glupczynski, 2006] y China (42,1%) [Yi, 2019]. En España, según las características de los distintos estudios, constituye la tercera [Ercibengoa, 2020] y cuarta [Valdezate, 2017] especie más frecuente, produciendo el 11,4% y 10,2% de los casos diagnosticados, respectivamente.

Complejo *N. nova*

En este complejo se encuentran valores muy variados. En España se dio en el 15% de los casos de nocardiosis [Valdezate, 2017], a diferencia de otros países donde es el agente etiológico mayoritario, como en Estados Unidos (28% en estudios de 2010 y 21,6% en 2020) [Uhde, 2010; Hamdi, 2020], en Canadá (27%) [Bambace, 2013], en Australia (48% y 29,6% entre 2010-2016 según la población de estudio) [Paige, 2018; Tan, 2020], y actualmente junto a *N. cyriacigeorgica* son las dos especies aisladas más frecuentemente en la mayoría de las regiones [Tan, 2020].

N. brasiliensis

El principal agente productor de micetoma e infecciones cutáneas en humanos sólo representó aproximadamente el 3-6% de los casos en España y Francia [Valdezate, 2017; Lebeaux, 2019]. Estas cifras aumentan si nos desplazamos a países de climas tropicales como Venezuela (45%) [Vera-Cabrera, 2008], o México (86%) [Vera-Cabrera, 2013], o climas subtropicales como Taiwán (~45%) [Lai, 2011; Tan, 2010]. En Europa sólo se ha descrito como la especie más predominante en Grecia [Maraki, 2009].

N. asteroides

A esta especie se le atribuyen un gran número de aislados siendo el principal agente etiológico en estudios realizados en Suiza [Matulionyte, 2004], o India [Nanam, 2016], entre otros muchos. Cuando la mayoría de los aislados clínicos se atribuyen a esta especie se debe sospechar de una identificación deficiente. Pues, cuando posteriormente se identifican estas cepas basándose en el análisis de secuencia de otros genes como *gyrB* o *hsp65* este complejo se divide en seis taxones. Por eso, actualmente *N. asteroides* ha dejado de ser las especies de *Nocardia* más comúnmente aisladas de los humanos [Conville, 2018]. Se estima que la mayoría de los aislamientos clínicamente significativos previamente identificado como *N. asteroides* pertenecen al patrón de sensibilidad a antimicrobianos tipo VI que corresponde a la especie *N. cyriacigeorgica* [Conville, 2007].

En el Anexo III se muestra una tabla resumen que detalla los principales estudios clínicos realizados en los últimos 20 años, que cuentan con un número significativo de cepas de *Nocardia* spp. para extrapolar un análisis (≥ 30 cepas), donde se aprecia la amplia y variada distribución de especies en todo el mundo.

4. Identificación de especies del género *Nocardia*

Debido a las peculiaridades de la pared bacteriana de las cepas de *Nocardia* spp. con la técnica de tinción de Gram las colonias aparecen de color violáceo (Gram positivo), mientras que, con la coloración de Ziehl-Neelsen tiñen débilmente por los ácidos micólicos de cadena larga presentes en su pared, visualizándose con microscopía como bacilos ramificados. Algunos bacilos presentan una tinción defectuosa, apareciendo como bacilos gramnegativos con inserciones grampositivas [Brown-Elliott, 2006].

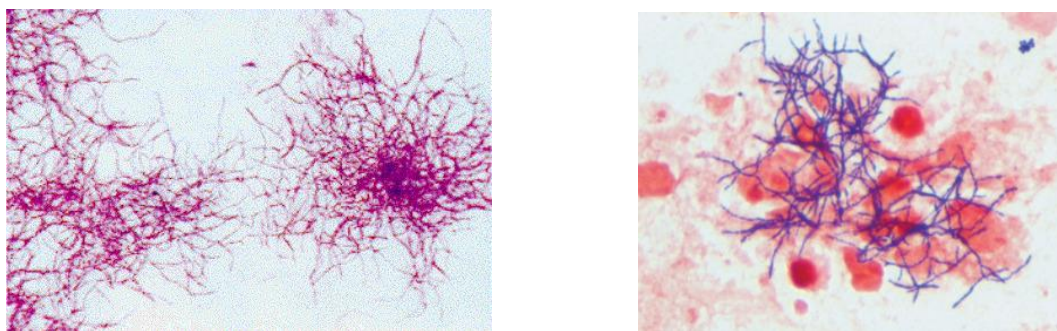


Figura 14 Coloración de colonias de *Nocardia* spp. para observación microscópica por tinción Ziehl Neelsen (izquierda) y tinción de Gram (derecha). Tomado de <http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/nocardia.html>

Para la identificación fenotípica de las especies del género *Nocardia* se utilizan las siguientes técnicas:

4.1. Pruebas bioquímicas

Muy extendidas en el pasado, actualmente se hallan en desuso debido a que no son capaces de diferenciar entre especies pertenecientes al mismo complejo, y principalmente comprenden: hidrólisis de adenina, esculina, caseína, hipoxantina y xantina; sustratos utilizados como fuente de carbono: glucosa, manitol y otros sustratos; crecimiento a 45° C; presencia de ureasa y de arilsulfatasa. Estas pruebas se detallan en el Anexo IV.

4.2 Patrón de sensibilidad a antimicrobianos

Según el perfil de sensibilidad y resistencia mostrado por una cepa en estudio se procedía a su asignación a diferentes especies o complejos, que eran categorizadas mediante el uso de números romanos.

Tabla 4 Clasificación de las principales especies del género *Nocardia* según su patrón de sensibilidad. Tomado de Brown-Elliott y colaboradores [Brown-Elliott, 2006]

Patrón de susceptibilidad	Especie	Patrón antibiótico característico
I	<i>N. abscessus</i>	Sensible a ampicilina, amoxicilina- ácido clavulánico, ceftriaxona, linezolid y amikacina. Alto número de resistencias a imipenem. Resistente a ciprofloxacino y claritromicina
II	<i>N. brevicatena/ N. paucivorans</i> complex, grupo sin nombre	Igual que el anterior, pero con CMI's para kanamicina bajas (<1µg/ml). Sensible a eritromicina, claritromicina, linezolid y ceftriaxona. CMI's para imipenem y amikacina muy bajas
III	<i>N. nova</i> complex (<i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. africana</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i>)	Sensible a ampicilina, eritromicina, claritromicina, linezolid y ceftriaxona, pero resistente a amoxicilina-ácido clavulánico. CMI's para imipenem y amikacina muy bajas
IV	<i>N. transvalensis</i> complex (<i>N. blacklockiae</i> , <i>N. wallacei</i>)	Resistente a todos los aminoglicósidos, incluido amikacina. Sensible a ciprofloxacino, ceftriaxona, linezolid e imipenem. Resistente a eritromicina y claritromicina
V	<i>N. farcinica</i>	Resistente a ampicilina, cefalosporinas de amplio espectro y claritromicina. Resistente a aminoglicósidos, excepto amikacina. Sensible a ciprofloxacino, linezolid e imipenem
VI	<i>N. cyriacigeorgica</i>	Resistente a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, claritromicina y ciprofloxacino. Sensible a ceftriaxona, amikacina, linezolid e imipenem.

Patrón de susceptibilidad	Especie	Patrón antibiótico característico
NA	<i>N. brasiliensis</i>	Sensible a minociclina, amoxicilina-ácido clavulánico y sulfametoxazol. Resistente a kanamicina, cefamandol, ampicilina, ciprofloxacino y claritromicina.
NA	<i>N. pseudobrasiliensis</i>	Sensible a ciprofloxacino, claritromicina y sulfametoxazol. Resistente a kanamicina, cefamandol, ampicilina, minociclina y amoxicilina-ácido clavulánico.
NA	<i>N. otitidiscaviarum</i>	Sensible a kanamicina, gentamicina, amikacina, sulfametoxazol y ciprofloxacino. Resistente a ceftriaxona, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, carbenicilina, linezolid e imipenem (en ocasiones resistente a todos los antibióticos beta-lactámicos)
VII	<i>N. asteroides</i> ATCC 19247	Cepa tipo ATCC sensible a ampicilina. El resto de sensibilidad siguiendo el patrón VI

NA: No aplicable.

La clasificación clásica generó una gran controversia al identificarse cepas pertenecientes a distintas especies con el mismo patrón de sensibilidad. De forma añadida, cepas pertenecientes a la misma especie mostraban perfiles de sensibilidad diferentes [Roth y cols., 2003].

4.3 Técnicas genotípicas en la identificación de especies

El empleo de los métodos de la sistemática molecular constituyó un gran avance en la clasificación bacteriana y facilitó la diferenciación que, hasta ese momento, era imposible entre algunas especies, apoyándose sólo en las técnicas fenotípicas. A partir de 1990 se desarrollaron distintos métodos, resultando ser ventajosos por su rapidez y sencillez.

Algunas de estas técnicas empleadas son:

4.3.1 Hibridación con sonda marcada: se realiza a partir de una hebra de ADN marcado de composición conocida y otra hebra como diana, procedente del organismo a identificar. Estos estudios de hibridación utilizando una sonda de ADN correspondiente a una región conservada de 89 pb del ARNr 16S confirmaron la presencia de al menos dos copias de este gen en las cepas del complejo *N. nova* [Conville, 2005].

4.3.2 Ribotipificación: La técnica consiste en la extracción de ADN cromosómico y su digestión con una endonucleasa de restricción, seguida de una electroforesis y un Southern blot usando sondas de ADN marcado, que se unen sólo a su hebra correspondiente. Esta técnica sólo ha sido eficaz en algunas especies concretas de *Nocardia*. Tras el empleo de *EcoRI* como enzima de restricción en 21 cepas del complejo *N. asteroides* sólo se diferenciaron 4 ribotipos distintos: 2 pertenecientes a *N. asteroides sensu stricto*, uno a *N. farcinica* y otro a *N. nova* [Laurent, 1996].

4.3.3 PCR-RFLP: La técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) consiste en la amplificación de un fragmento del genoma preferentemente flanqueado por zonas conservadas donde hibridaran las parejas de cebadores específicos para el gen que se desee amplificar. Posteriormente se procede a su digestión por las enzimas de restricción y se visualiza el resultado por electroforesis en geles de agarosa. En la actualidad la técnica de RFLP está en desuso ya que su resultado debe ser confirmado por la secuenciación del gen ARNr 16S [Fatahi-Bafghi, 2018].

Un tipo de estudio basado en RFLP es el método PRA (*PCR restriction enzyme pattern analysis*), una de las primeras técnicas moleculares empleadas en la caracterización e identificación de las distintas especies de *Nocardia* spp. Aunque da buen resultado para diferenciar especies de *Mycobacterium* spp., el empleo de PRA para el gen *hsp65* en la identificación de especies de *Nocardia* no es adecuado, pues al comparar los resultados con el análisis de la secuencia de ARNr16S aparecen cepas con un patrón de PRA de *N. asteroides* tipo VI que en realidad pertenecen a las especies *N. cyriacigeorgica* o *N. abscessus* [Rodríguez-Nava, 2006].

4.3.4. Secuenciación de dianas de uso taxonómico

4.3.4.1. Análisis y secuenciación del gen del ARNr 16S o gen *rrs*

El ribosoma bacteriano, de 70S, se puede dividir en 2 subunidades según su coeficiente de sedimentación, una de 30S y otra de 50S. La subunidad 30S contiene el ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) y 21 proteínas más, numeradas desde S1-S21, donde S indica su pertenencia a la subunidad menor, *small* [Rodicio, 2004].

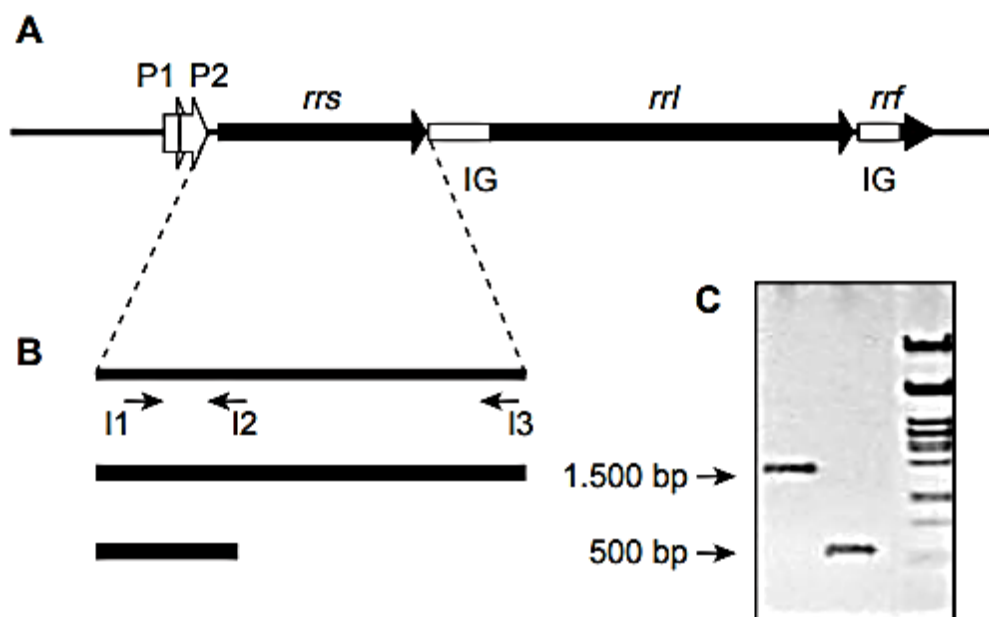


Figura 14 El operón ribosómico (*rrn*). A) Genes estructurales que forman el operón ARNr (*rrs*, *rrl* y *rrf*), promotores P1 y P2, y las regiones intergénicas (IG). B) Método de amplificación del gen *rrs* (ARNr 16S). Se muestran los iniciadores I1 (directo), I2 e I3 (reversos) utilizados en la amplificación (y posterior secuenciación) del gen completo (de I1 a I3 da un gen de tamaño 1500 pb, aproximadamente) o de un fragmento menor (de I1 a I2, unos 500 pb). C) Visualización de ambos fragmentos por electroforesis en gel de agarosa. Tomado de Rodicio y colaboradores [Rodicio, 2004]

La molécula de ARNr 16S contiene 1.540 nucleótidos o pares de bases (pb), y se pliega en una estructura secundaria, que presenta segmentos de doble cadena en los extremos, alternando con regiones de cadena sencilla, dividida en tres dominios: 5', central y 3' (menor y mayor).

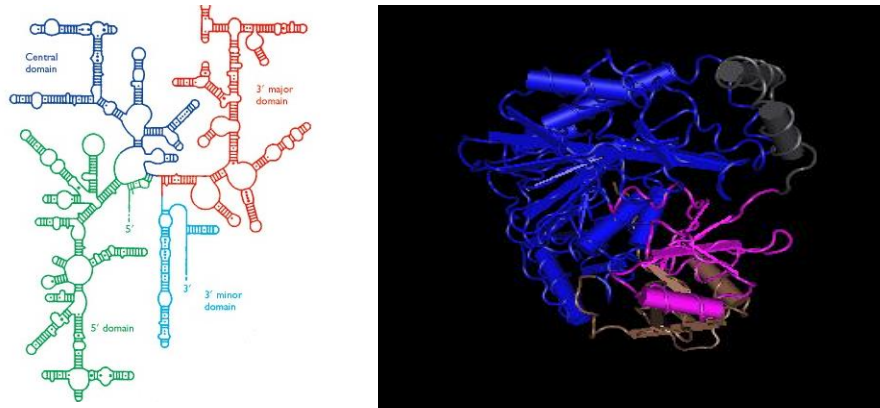
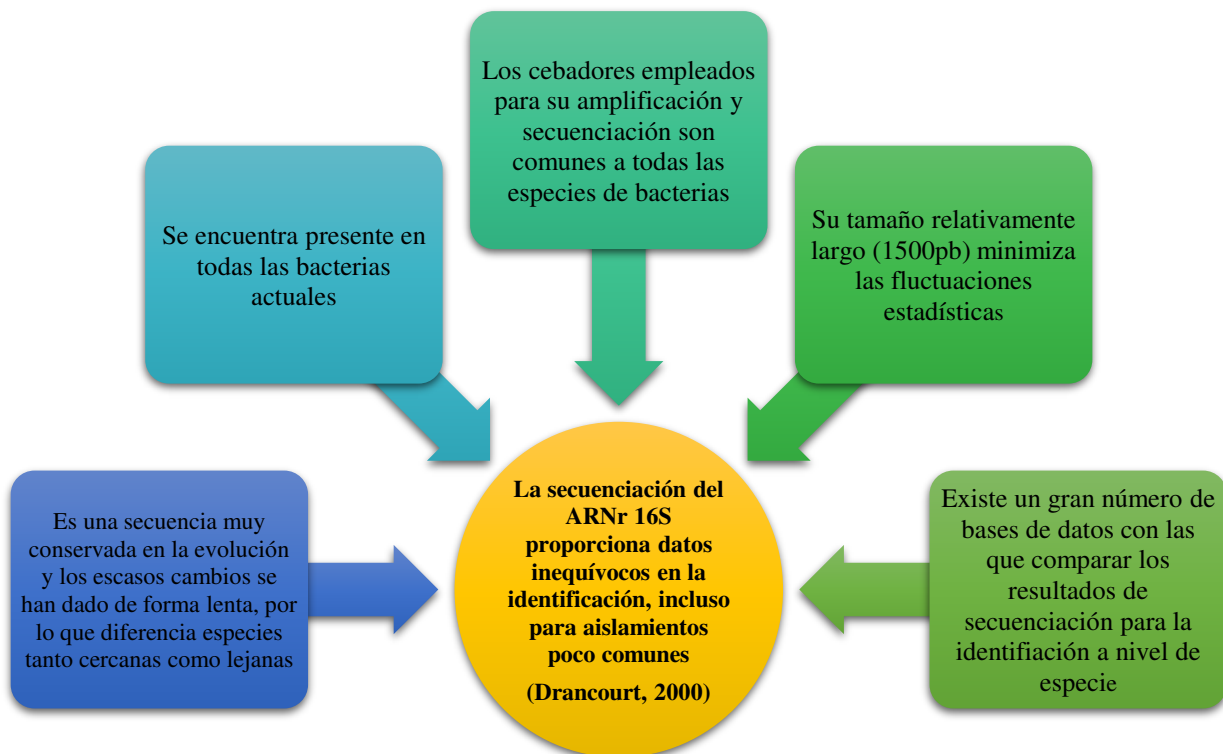


Figura 15 Estructura secundaria (izquierda) y proteína codificada por el gen ARNr 16S (derecha). Tomadas de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Ya en la década de los 70', Carl Woese y colaboradores sugirieron su utilidad como cronómetro molecular [Rodicio, 2004]. El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada para estudios de taxonomía bacteriana y filogenia [Drancourt, 2000]. La elección de esta macromolécula como técnica universal de referencia para la identificación de bacterias se debe a sus características esenciales:



Las bases de datos con secuencias de referencia de las que se dispone para comparar la secuencia del ARNr 16S para la asignación de especies son:

- De acceso público: GenBank NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), RDP (*Ribosomal Database Project*), RIDOM (*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms*), BIBI (*Bio-informatic Bacteria Identification*).

- De organizaciones privadas: MicroSeq (*Applied Biosystems*) y SmartGene IDNS (*Integrated Database Network System*).

Todas las especies de *Nocardia* presentan una región variable cerca del extremo 5' del gen ARNr 16S, por lo que la secuencia parcial de ~500 pb permite la diferenciación de la mayoría de las especies actualmente reconocidas. No obstante, para el reconocimiento de una nueva especie o para la discriminación entre especies próximas se requiere de la secuenciación del gen completo (1500pb) [Conville, 2018].

La hibridación ADN-ADN ha demostrado que secuencias de *Nocardia* spp. con un porcentaje de similitud superior al 99,8% con las depositadas en las bases de datos oficiales obtenidos por la técnica del ARNr 16S podían corresponder a especies distintas a las obtenidas por secuenciación de este gen [Conville, 2005]. Por esto, en la actualidad los criterios para la identificación de *Nocardia* spp. basados en el gen ARNr 16S y su comparación con las secuencias de las bases de datos, aunque siguen las indicaciones del “Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI), son más restrictivos para *Actinomyces* y *Nocardia* que para otros géneros. En estos casos se considera una similitud del 99,6% o superior para considerar que dos cepas pertenecen a la misma especie. Además, este documento recomienda una similitud en las secuencias entre 99,0 y 99,5% para ser consideradas del mismo género [Petti, 2008]. Para taxones más altos que el nivel de género, los puntos de corte se calculan utilizando la base de datos de secuencias de ARNr 16S de las especies bacterianas con nombres válidamente publicados y actualizada regularmente que se encuentra en el *Living Tree Project*¹⁵ (LTP). El LTP sólo considera secuencias del ARNr 16S de moderada a buena calidad, de tamaño mayor a 1.450 nucleótidos y con la proporción media de posiciones ambiguas inferior al 1%. Según esto, una identidad de secuencia del 94,5% o inferior discrimina entre cepas de distinto género (un criterio menos estricto que el aplicado para *Nocardia* spp.), el 86,5% o menos indica que pertenecen a distintas familias, el 82,0% o menos de distintos órdenes, 78,5% o menos de distintas clases y 75,0% o menos de distinto filum [Yarza, 2014].

Un inconveniente de la identificación de cepas del género *Nocardia* a través de la secuenciación de esta macromolécula es que ha sido descrita la presencia de varias copias de este gen en especies como las pertenecientes al complejo *N. nova* [Conville, 2005]. En este caso se recomienda el empleo de genes alternativos para su identificación.

La secuenciación actual de gran número de genomas completos ha permitido obtener varios cientos de miles de nuevas secuencias de ARNr 16S anualmente y ha revelado una gran diversidad previamente oculta que requiere de identificación y clasificación taxonómica [Yarza, 2014].

4.3.4.2 *Análisis y secuenciación del gen gyrB*

Es el gen que codifica para la subunidad β de la enzima ADN girasa. La ADN girasa o topoisomerasa II y la topoisomerasa IV son enzimas "altamente conservadas" que juegan un papel esencial en la replicación y transcripción del ADN. El mecanismo de acción de estas enzimas implica la escisión del ADN y el paso de una segunda cadena doble de ADN a través de la ruptura, seguido de una nueva ligadura del ADN escindido. Tanto la enzima girasa como la topoisomerasa IV son heterotetrameros funcionales altamente homólogos. Sus subunidades se denominan GyrA / GyrB (dos monómeros A y dos monómeros B, codificados por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente) y ParC / ParE (igualmente codificada por los genes *parC* y *parE*), respectivamente. Las subunidades GyrB y ParE incluyen un dominio ATPasa que, al catalizar la hidrólisis de ATP, proporcionan la energía necesaria para la escisión producida por enzimas, proceso que tiene lugar bajo el control de las otras dos subunidades. La ADN girasa actúa introduciendo superenrollamientos negativos en la molécula de ADN y participa en su alargamiento, mientras que la acción de topoisomerasa IV consiste en la decatenación de los cromosomas hijos y la relajación del ADN. Tanto el superenrollamiento como la decatenación son mecanismos de control esenciales durante la replicación celular, y los compuestos que interfieren con estas reacciones finalmente causan la muerte de las células bacterianas. La enzima topoisomerasa II es la diana de dos clases de antibióticos, las aminocumarinas, como la novobiocina, que inhiben el dominio ATPasa de las enzimas, pero presentan alta toxicidad clínica, y las fluoroquinolonas. Mutaciones puntuales localizadas en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas "*quinolone determining resistance region*", en ambos tetrámeros, confieren resistencia a la bacteria frente a estos antibióticos [D'Atanasio, 2020].

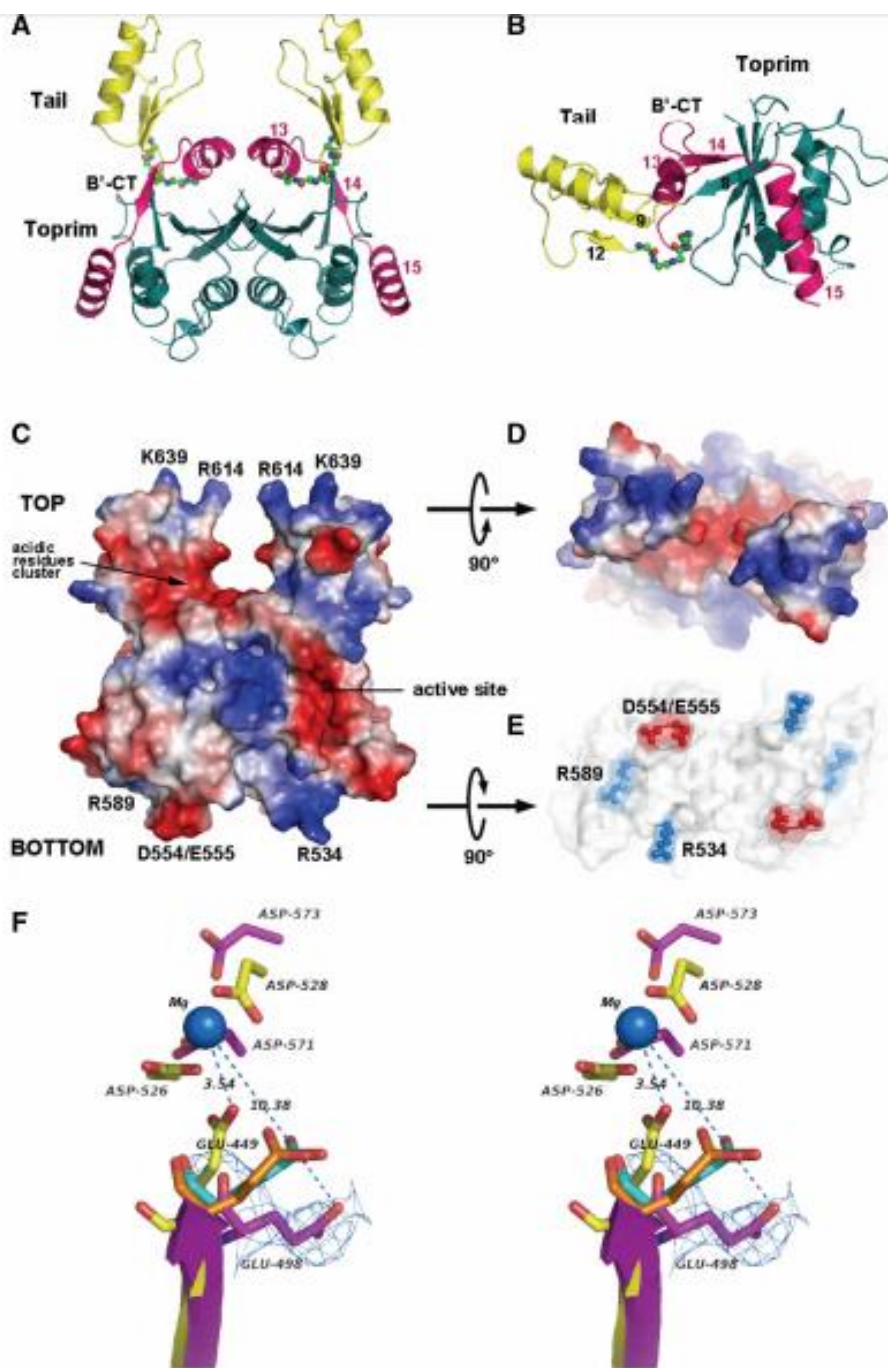


Figura 16 Estructura general de la proteína GyrB. (A) Representación del dímero GyrB. Los dominios *Tail* y *Toprim* están coloreados en amarillo y verde, respectivamente. El segmento C-terminal (B0-CT) se resalta en color rosa. (B) Monómero GyrB visto desde otra orientación. (C) Mapas de potencial electrostático de la superficie del dímero GyrB y su vista superior (D) y vista inferior (E). (F) La vista estéreo de la superposición del sitio activo entre GyrB y sus homólogos topo II que muestran grandes variaciones de los residuos de glutamato conservados (Glu449 en topo II y Glu498 en GyrB). Tomado de D'Atanasio y colaboradores [D'Atanasio, 2020].

El uso de *gyrB* como herramienta filogenética está altamente extendido [Kim, 2012]. Por ejemplo, en el género *Micromonospora* se ha encontrado que una distancia genética en el gen *gyrB* de 0,014 se correlaciona con una relación de ADN del 70% y que esas cepas con una distancia genética de más de 0,014 probablemente sean especies distintas. Para las cepas de género *Klebsiella* las distancias genéticas encontradas oscilan entre 0,0164 y 0,1495, por lo que el valor de distancia genética 0,014 también se recomienda como el umbral para la delimitación de especies dentro de este género [Kirby, 2010]. Cuando se ha estudiado en cepas de *Nocardia* spp., el rango de identidad entre especies (porcentaje de nucleótidos idénticos entre secuencias) de las secuencias del gen *gyrB* fue del 82,4–99,9%, correspondiente a diferencias de nucleótidos de 270-272. Sin embargo, para una secuencia de 1.350pb de ARNr 16S, con un rango de similitud del 94,4–100,0%, correspondiente a diferencias de 75 nucleótidos. Estos datos indican que el grado de divergencia del gen *gyrB* en *Nocardia* spp. es aproximadamente 3,6 veces mayor que el del gen ARNr 16S. A partir de estos estudios se recomienda tomar el valor de 93,5% de identidad en *gyrB* como punto de corte para atribuir una cepa a una especie concreta [Takeda, 2010].

También resulta de utilidad este gen para diferenciar cepas del género *Nocardia* de otras especies de actinomicetales. Las identidades intergéricas entre *Nocardia* y los otros géneros alcanzan valores de 68,1% a 87,3%, cuando se analiza la secuencia del gen *gyrB*. Para las secuencias del ARNr 16S, las identidades son mayores, de 88,9-97,2%. Estos datos otorgan al gen *gyrB* un poder discriminatorio aproximadamente 3,8 veces mayor que el del ARNr 16S para diferenciar las especies de *Nocardia* de otros actinomicetales [Takeda, 2010].

4.3.4.3. Secuenciación del gen *hsp65*

Es el gen que codifica para la proteína de shock térmico de 65 kilodaltons (*heat shock protein* 65-KDa). Tanto los organismos eucariotas como procariotas responden al shock térmico y a otros factores de estrés mediante la síntesis de unas proteínas conocidas como *heat-shock protein* (Hsp). Actúan como chaperoninas, proteínas que proporcionan condiciones favorables para el correcto plegamiento de otras proteínas, evitando así la agregación. Basándose en la secuencia del gen *hsp65* se puede llegar a la identificación directamente por secuenciación y comparación con las secuencias de referencia, o bien digerirse posteriormente con enzimas de restricción para estudiar el patrón mostrado, lo que se denomina PRA (*PCR restriction enzyme pattern analysis*) [Chimara, 2008]. En el caso de *Nocardia* spp. se ha

llegado a la conclusión de que el empleo del gen *hsp65* puede conducir a la identificación errónea de especies de aislamientos tanto clínicos como ambientales, pues no es capaz de diferenciar especies como *N. africana*, *N. cummidelens*, *N. nova*, *N. soli* y *N. veterana* [Rodríguez-Nava, 2006]. Aunque *hsp65* muestra un mejor poder discriminatorio que el ARNr 16S a nivel de especie, es mayor el observado en los genes *gyrB* y *rpoB* [Carrasco, 2013].

4.3.4.4. Análisis y secuenciación del gen *rpoB*

Este gen codifica una de las proteínas implicadas en la síntesis de la subunidad β de la RNA polimerasa ADN dependiente. Se encuentra en todos los organismos que necesitan enzimas para la transcripción de ADN a ARN. La subunidad β contiene entre 900 y 1.400 residuos aminoacídicos.

Esta es la diana del antimicrobiano rifampicina que, con su unión, impide la transcripción en la bacteria. Mutaciones en este gen le confiere al microorganismo la resistencia frente a este antibiótico. Su determinación es muy importante sirviendo para diferenciar especies patógenas y no patógenas del género *Mycobacterium*, entre otros usos [Heep, 2001].

En un estudio de 2007 de una población bacteriana que pertenece al mismo ecosistema, se compararon los genes *rpoB* y ARNr 16S a varios niveles taxonómicos para determinar su capacidad de resolver las relaciones filogenéticas, y *rpoB* mostró mayor resolución filogenética en la mayoría de los casos, apreciándose que ninguno de los dos genes da buen resultado si se emplea de forma independiente [Case, 2007].

También, debido a sus características, es un buen marcador ecológico, porque, como se indica a continuación:



Más recientemente en un estudio de identificación y sensibilidad de cepas de *Nocardia*, una fracción del gen *rpoB* de 352 pb fue secuenciado para confirmar la especie de los aislamientos seleccionados. Es de destacar que en casos como *N. beijingensis* el gen *gyrB* tuvo que emplearse para completar esta identificación [Wei, 2017].

4.3.4.5. *Análisis y secuenciación del gen secA1*

Este gen codifica para la proteína SecA1, que se encuentra en el periplasma. En eubacterias interactúa con SecY y SecE, todas componentes esenciales de la preproteína ATPasa traslocasa, que está involucrada en el transporte de proteínas a través de la membrana citoplasmática de la célula bacteriana. Pertenece a la superfamilia 2 (SF2) de las helicasas. Las helicasas son proteínas que participan en muchos de los aspectos del metabolismo del ARN como la biogénesis ribosomal, la remoción de intrones, la transcripción, la traducción y la degradación de ARN mensajero. Varía su expresión según las condiciones de crecimiento (stress, luz, temperatura). Son motores moleculares que relajan cadenas dobles de ARN (dsARN) afectando a la estructura secundaria del ARN [Vrontou, 2004].

Su análisis es útil para diferenciar especies similares, como es el caso de *N. abscessus* y *N. asiatica* [Conville, 2006], especies que no son diferenciables con el estudio del gen ARNr 16S si este no es secuenciado por completo. Se encuentra una alta variabilidad en la secuencia del gen *secA1* dentro de un tramo de 470 pb, lo que, junto con el análisis de su proteína derivada ha demostrado ser prometedor para el reconocimiento y la discriminación entre las principales especies de *Nocardia*, incluyendo la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas (por ejemplo, *N. brevistecana* y *N. paucivorans* o *N. nova* y *N. veterana*) [Kong, 2010]. Además, a diferencia del gen ARNr 16S en el que se ha demostrado la existencia de múltiples copias, al menos en algunos aislados, hay pocas evidencias que sugieran que existen múltiples copias del gen *secA1* en las especies de *Nocardia* [Conville, 2006]. Ya que el análisis de la secuencia del ARNr 16S por si solo proporciona una resolución insuficiente a nivel de especie para muchas cepas de *Nocardia* spp., recientemente se ha empleado el gen *secA1* para la correcta identificación y selección de las especies incluidas en estudios de sensibilidad antibiótica [Tan, 2020].

4.3.5. Empleo del esquema MLSA para la identificación de especies de *Nocardia*

El esquema MLSA ha demostrado ser muy eficaz en la identificación de las especies de *Nocardia* clínicamente importantes [Gnamam, 2020]. El esquema MLSA cuenta con un alto poder de discriminación, superior a la secuenciación del ARNr 16S rRNA de forma independiente y al análisis por MALDI-TOF MS, para la identificación de especies clínicas de *Nocardia*. Los resultados obtenidos en estudios realizados recientemente sugieren que podría convertirse en el enfoque principal en taxonomía bacteriana y en la identificación a nivel de especie [Conville, 2017; Wei, 2019; Gnamam, 2020].

En los esquemas de MLSA las secuencias normalmente se concatenan para superar la falta de resolución observada en la topología de los árboles cuando se analiza un solo gen, pero este método puede enmascarar los diferentes procesos evolutivos subyacentes a los genes individuales. Además, no hay consenso sobre los puntos de corte en la variación para la asignación de especies, en parte debido a que los diferentes genes evolucionan a diferentes velocidades. En este caso, unos pocos genes seleccionados representan solo una fracción de la vasta cantidad de información contenida dentro de un genoma completo [Colston, 2014].

Tabla 5 Ejemplo de algunos estudios que emplean MLSA como técnica de identificación de cepas de *Nocardia* spp.

Número de genes	Genes incluidos en el esquema propuesto	Autor principal, año de estudio	Título de la publicación, autor principal
5	ARNr 16S, <i>gyrB</i> , <i>secA1</i> , <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i>	McTaggart, 2010	Phylogeny and Identification of <i>Nocardia</i> Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis
5	ARNr 16S, <i>gyrB</i> , <i>secA1</i> , <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i>	Xiao, 2016	Accurate Identification of Common Pathogenic <i>Nocardia</i> Species: Evaluation of a Multilocus Sequence Analysis Platform and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
7	<i>gyrB</i> , <i>hsp65</i> , <i>secA1</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoA</i> , <i>recA</i> , <i>trpB</i>	Du, 2016	Genotyping of <i>Nocardia farcinica</i> with multilocus sequence typing
5	ARNr 16S, <i>gyrB</i> , <i>secA1</i> , <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i>	Wei, 2018	Molecular identification and phylogenetic relationships of clinical <i>Nocardia</i> isolates
5	ARNr 16S, <i>gyrB</i> , <i>secA1</i> , <i>rpoB</i> , <i>hsp65</i>	McTaggart, 2018	Incubation time and culture media impact success of identification of <i>Nocardia</i> spp. by MALDI-TOF mass spectrometry
8	<i>atpD</i> , <i>groL1</i> , <i>groL2</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> , <i>secY</i> , <i>sodA</i> , <i>ychF</i>	Tamura, 2018	Reclassification of <i>Nocardia</i> species based on whole genome sequence and associated phenotypic data
5	ARNr 16S, <i>secA1</i> , <i>hsp65</i> , <i>rpoB</i> , <i>gyrB</i>	Huang, 2019	Clinical features, identification, antimicrobial resistance patterns of <i>Nocardia</i> species in China: 2009–2017
4	ARNr 16S, <i>gyrB</i> , <i>hsp65</i> , <i>secA1</i>	Gnanam, 2020	Molecular identification of <i>Nocardia</i> species causing endophthalmitis using multilocus sequence analysis (MLSA): a 10-year perspective

Si bien la técnica MLSA proporciona una mayor precisión en la identificación de aislamientos de *Nocardia* spp., se han encontrado varias limitaciones:

- 1) No es capaz de resolver la identificación de cepas que pertenecen a especies poco comunes o a complejos (por ejemplo *N. abscessus* y *N. artritidis* en el complejo *N. transvalensis*)
- 2) Es más tedioso para muchos laboratorios clínicos secuenciar 4 o 5 genes, que un sólo gen como el ARNr 16S para la identificación. Por lo tanto, se han abreviado esquemas MLSA con 3 genes, o incluso 2 [Conville, 2018].

3) No existe una página que compile y codifique los alelos existentes de cada gen para cada especie, ni para los secuencio-tipos derivados de los concatémeros resultado de la combinación de los genes del esquema.

4) No existen unos primer universales para todas las especies

Aun así, en la actualidad, se recomienda emplear esta técnica para la identificación si las demás dianas fallan.

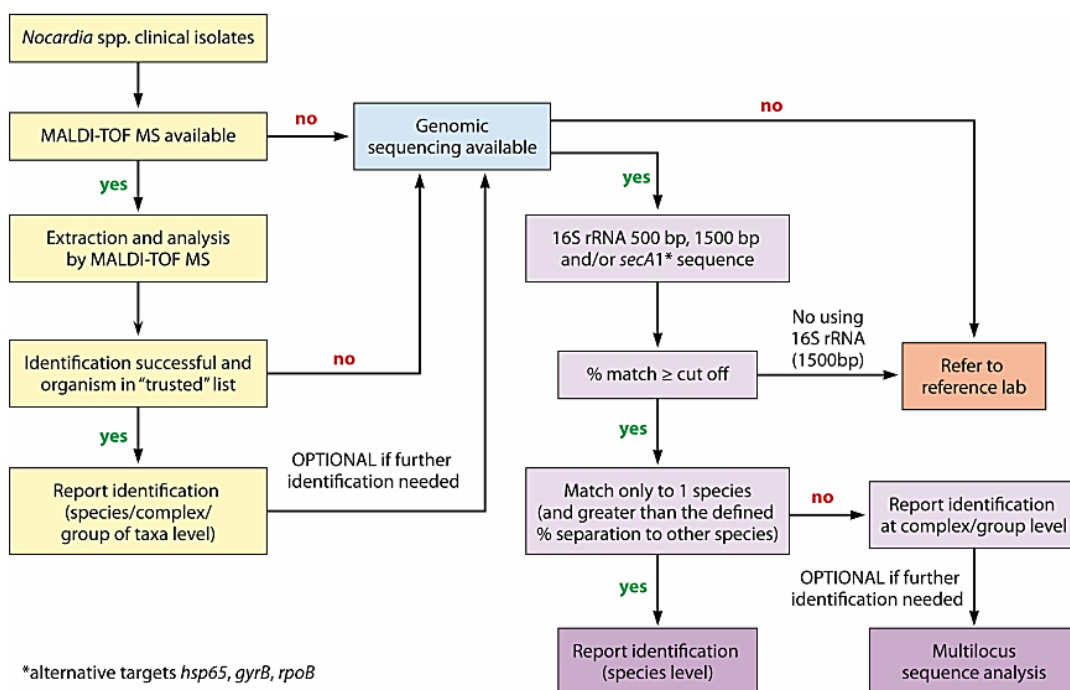


Figura 16 Flujo de trabajo recomendado para la identificación de aislados de *Nocardia* spp. Tomado de Conville, y colaboradores [Conville, 2017]

4.4 Técnicas proteómicas

La técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight*) es una técnica de espectroscopía de masas que permite identificar distintas bacterias basándose en su perfil proteico. El éxito de la espectroscopía de masas solo es posible debido a varios descubrimientos previos importantes, como la ionización por electropulverización (ESI) descubierta por John Fenn y la

desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), descubierto por Koichi Tanak. En 1993, Drucker y Fenselau emplearon por primera vez esta técnica para la identificación de microorganismos basándose en el análisis de sus constituyentes celulares, ahora se identifica a partir del extracto proteico completo, principalmente a partir de los patrones espectrales de los ribosomas y otras proteínas abundantes en las células procariontas [Jang, 2018].

Es un método de ionización "suave" que preservan el analito intacto durante el análisis. Este analito necesita ser co-cristalizado junto a un exceso molar de matriz (generalmente un material orgánico ácido que absorbe los rayos UV). Los ácidos α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) y 2,5-dihidroxibenzoico son las matrices más empleadas en el análisis microbiológico [Hou, 2019]. Los iones de la muestra son generados por radiación láser, seguida de procesos de desorción e ionización. La matriz juega un papel clave porque absorbe la energía del láser e indirectamente hace que el analito se vaporice. Se generan así principalmente iones individualmente cargados. Un analizador de masa de tiempo de vuelo (TOF) mide el tiempo dependiente de la masa requerido para que estos iones se muevan desde la fuente hasta el detector, determinando las masas de los iones por el tiempo que tardan en viajar esta distancia [Jang, 2018].

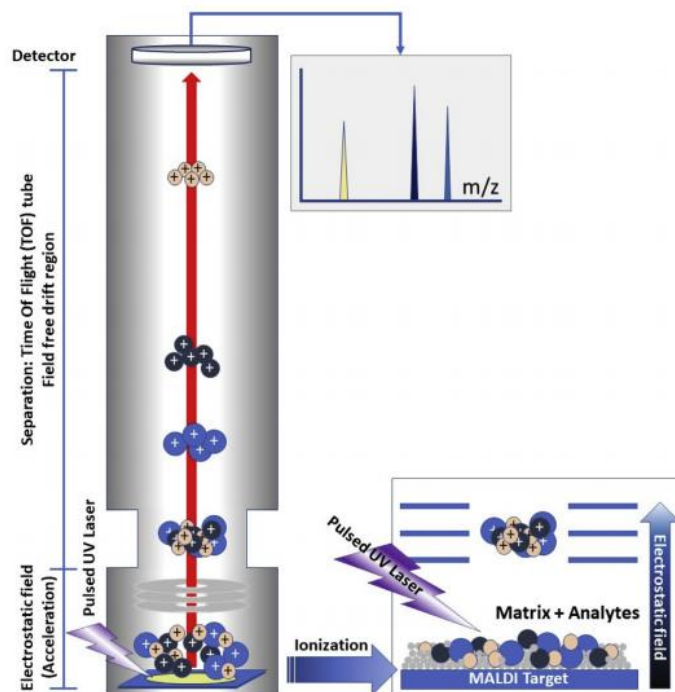


Figura 16 Esquema de la metodología MALDI-TOF MS. La muestra se co-cristaliza con la matriz en el objetivo de la muestra y se desorbe e ioniza por la fuente de iones MALDI (por ejemplo, un láser ultravioleta). Las moléculas de iones, incluidas las proteínas de los microorganismos, son acelerados por el campo eléctrico en el analizador de TOF. Todos los iones están separados de acuerdo con la relación m/z y origina un espectro de masas. Tomado de Hou y colaboradores [Hou, 2019]

Se ha empleado la técnica MALDI-TOF para la identificación de organismos fastidiosos y de crecimiento lento, como no fermentadores gramnegativos, levaduras o micobacterias que son difíciles de identificar mediante pruebas convencionales [Verroken, 2010].

Se recomienda la siembra en un medio que promueva el crecimiento rápido (p. ej., CBA a 35°C) para obtener identificaciones correctas a nivel de especie [McTaggart, 2018]. Debido al grosor e hidrofobicidad de la pared celular de las cepas de *Nocardia* spp., que contiene una gran cantidad de ácidos micólicos, un tratamiento previo de las cepas es obligatorio antes del análisis por MALDI-TOF MS. La extracción por ácido etanol/ácido fórmico por sí solo no resulta eficiente para permitir que las proteínas de la membrana sean ionizadas por la matriz. Un tratamiento previo de hervido en 500 µl de agua destilada durante 30 minutos produce la ruptura de la pared celular. Otra alternativa para la extracción es sumergir las colonias de *Nocardia* spp. tres veces en nitrógeno líquido a -196°C durante 5 segundos [Verroken2010]. Se recomienda la técnica del hervido durante 30 minutos por su sencillez y seguridad. Pasos previos de sonicación y congelación también pueden ser empleados para las cepas más resistentes [Carrasco, 2016].

Los perfiles proteicos de la cepa de estudio son comparados con los espectros depositados en las bases de datos de las distintas plataformas, ya sean comerciales o elaboradas en el propio laboratorio (biblioteca *in-house*). Es una técnica con ventajas, pero que continúa presentando ciertas limitaciones. Las cepas que tienen una carga genética muy similar o gran variabilidad intraespecie no se pueden distinguir por la señal de espectrometría de masas y, por lo tanto, no se obtienen resultados de identificación de alta confianza [Hou, 2019]. En el caso de cepas de *Nocardia* las bases de datos proporcionadas por la casa comercial pueden ser limitadas, siendo insuficiente para la identificación de especies poco comunes [Segawa, 2015]. La ampliación de esta base de datos se hace en ocasiones necesaria, de hecho, la mayor limitación para alcanzar la identificación por MALDI-TOF se explica por un contenido insuficiente de organismos por parte de las bases de datos comerciales [Verroken, 2010]. Los sistemas de identificación MALDI Biotyper® y Vitek MS® son los más empleados. La base de datos Vitek 3.0 actualizada a 2017 es capaz de identificar hasta el 94% de los aislados de *Nocardia* spp. [Girard, 2017]. En el caso de la base de datos *Bruker Daltonics Biotyper* las cifras oscilan entre 14,9–80,4% según los distintos estudios cuando se evalúa esta biblioteca comercial sin añadir más espectros propios [Xiao, 2016]. Son resultados con tendencia a verse influidos según el número, especies y características de la población de estudio.

Dentro del género *Nocardia*, mientras que algunas especies se pueden identificar fácilmente, como es el caso de *N. brasiliensis*, en otros casos la identificación sólo ha llegado hasta el nivel de complejo (complejo *N. abscessus*, complejo *N. brevicatena-N. paucivorans*, complejo *N. nova* y complejo *N. transvalensis*). La identificación de especies poco comunes sigue siendo un desafío, debido también a que se han descrito variaciones en los perfiles espectrales para algunas especies, como por ejemplo *N. cyriaciageorgica*, y no está claro si estas variaciones se deben o no a la heterogeneidad taxonómica [Conville, 2017]. Esto hace necesario que la base de datos cuente con más de un perfil para cada especie de *Nocardia* [Brown-Elliott, 2019].

En comparación con la identificación mediante el esquema MLSA se observa la ventaja de la mayor rapidez en la obtención de resultados (2–3 días para MALDI-TOF en comparación con 1 semana para MLST) [McTaggart, 2018]. MALDI-TOF MS es particularmente útil para identificar especies patógenas frecuentemente aisladas, sin embargo, su capacidad para identificar especies aisladas con poca frecuencia sigue siendo cuestionable. Se ha demostrado que plataformas como Truebac ID basadas en datos de secuenciación masiva identifican con mayor éxito la mayoría de los aislamientos que MALDI-TOF MS es incapaz de identificar [Ha, 2019].

4.5 Técnicas de Secuenciación Masiva

La secuenciación masiva ha transformado la microbiología, sobre todo desde que se ha hecho más accesible al reducir costes, acortar los procesos de análisis, y al desarrollo de herramientas bioinformáticas que permiten el análisis de estos resultados. Son técnicas que proporcionan un mayor conocimiento para realizar una mejor identificación bacteriana. Debido a la importancia de la técnica de secuenciación masiva en este estudio, el tema será desarrollado en el punto 7 de esta introducción.

5. Susceptibilidad y resistencia antimicrobiana en *Nocardia* spp.

5.1 Sensibilidad antimicrobiana del género *Nocardia*

Para la resolución de los diferentes cuadros clínicos de nocardiosis, la terapia antimicrobiana inicial requiere la cobertura de un amplio número de especies que presentan perfiles de resistencia muy diferentes y la concentración adecuada en los órganos y tejidos afectados. Sin embargo, definir el tratamiento óptimo es difícil debido a la falta de datos clínicos comparativos y prospectivos. Esto hace que la propuesta para la mayoría de los regímenes antibióticos actualmente se base en datos microbiológicos, incluida la identificación previa de la especie infectiva y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana (AST) [Larruskain, 2011; Schlaberg, 2014]. En los primeros estudios de identificación de *Nocardia* spp. en humanos, la clasificación de los aislamientos se limitaba a las seis especies o grupos de especies basándose en sus perfiles de sensibilidad (patrón I a VI) [Conville, 2018]. Aunque estos patrones de sensibilidad ya no son empleados para la identificación, el conocimiento de su sensibilidad continúa siendo esencial para guiar los tratamientos de las infecciones por *Nocardia* spp. [Tan, 2020]. En la tabla 6 se muestra la descripción de cada uno de estos patrones. Desafortunadamente, no todas las cepas poseen el patrón de sensibilidad que normalmente corresponde a su especie [Valdezate, 2017].

Tabla 6 Patrones de sensibilidad antibiótica descritos para las principales especies de *Nocardia* según el *Clinical and Laboratory Standard Institute* [CLSI, 2018].

Species/Complex	Drugs									
	Amoxicillin-Clavulanate	Ceftriaxone	Imipenem	Ciprofloxacin	Minocycline	Linezolid	Sulfonamides*	Amikacin	Tobramycin	Clarithromycin
<i>N. cyriacigeorgica</i>	R	S	S	R	V	S	S	S	S	R
<i>N. abscessus</i>	S	S	V	R	V	S	S	S	V	R
<i>N. nova</i> complex†	R	S	S	R	V	S	S	S	R	S
<i>N. transvalensis</i> complex‡	V	S	V	S	V	S	S	R	R	R
<i>N. farcinica</i>	S	R	V	S	V	S	S	S	R	R
<i>N. brasiliensis</i>	S	V	R	R	S	S	S	S	S	R
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	R	V	R	S	R	S	S	S	S	S
<i>N. otitidiscaviarum</i>	R	R	R	S	V	S	S	S	V	V

*Incluye Trimetoprim-sulfametoxazol

†: Incluye al menos las especies *N. nova*, *N. africana*, *N. elegans*, *N. kruczakiae* y *N. veterana*

‡: Incluye *N. blacklokliae*, *N. transvalensis* y *N. wallacei*

R: Resistente; S: Sensible; V: Variable

El principal desafío en el campo de los estudios de sensibilidad de *Nocardia* spp. es la falta de datos que correlacionen los resultados del estudio de sensibilidad con los resultados clínicos. Como consecuencia, las directrices técnicas para el tratamiento de la nocardiosis se derivan de estudios *in vitro* con limitaciones en la reproducibilidad y la técnica de cada método [Lebeaux, 2019].

5.2 Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Los tests de sensibilidad antibiótica se realizan según las directrices del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). En 2003 se publicó un estándar aprobado (M24A) para las pruebas de sensibilidad de micobacterias, nocardias y otros actinomicetos aeróbicos [Conville, 2012]. Este documento ha sido actualizado en 2011 y 2018 (M62). En él se establecen los protocolos de: preparación del inóculo (ruptura de las colonias con perlas de vidrio), microdilución en caldo (turbidez de 0,5 McFarland, 72 horas de incubación), E-test (turbidez 1.0 McFarland, 48-72 horas de incubación) y difusión en disco (0,5 McFarland y 3-5 días de incubación). Los distintos métodos para el estudio de la sensibilidad antibiótica empleados en cepas de *Nocardia* se detallan en el Anexo V.

Actualmente, el único criterio disponible para la interpretación de las cepas en las categorías, sensible e intermedio, y resistente son los que aporta el CLSI:

Tabla 6 Agentes antibióticos y puntos de corte para las cepas de *Nocardia* spp. y afines según el documento de CLSI, 2018.

Agente antimicrobiano	CMI, µg/ml			Comentarios
	S	I	R	
Amikacina	≤ 8	-	≥ 16	
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16	
Ceftriaxona	≤ 8	16-32	≥ 64	
Ciprofloxacino	≤ 1	2	≥ 4	Ciprofloxacino y levofloxacino pueden ser intercambiables

Agente antimicrobiano	CMI, µg/ml			Comentarios
	S	I	R	
Clarithromicina	≤ 2	4	≥ 8	Representativo de los macrólidos más novedosos
Doxiciclina	≤ 1	2-4	≥ 8	
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16	
Linezolid	≤ 8	-	-	
Minociclina	≤ 1	2-4	≥ 8	
Moxifloxacino	≤ 1	2	≥ 4	
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	≥ 2/38	-	≥ 4/76	
Tobramicina	≤ 4	8	≥ 16	
Vancomicina	≤ 2	4-8	≥ 16	

5.3 Sensibilidad a antimicrobianos de las especies prevalentes en España

En el estudio realizado por nuestro laboratorio que incluía una población de aproximadamente 1.200 cepas aisladas en nuestro país durante un período de 10 años (2005-2014) se observaron los siguientes perfiles de susceptibilidad para las especies más prevalentes en nuestro país:

N. cyriacigeorgica: especie asociada con el patrón de sensibilidad tipo VI, se caracteriza por la resistencia a la ampicilina, claritromicina y ciprofloxacina, resistencia intermedia a amoxicilina / ácido clavulánico y sensibilidad a ceftriaxona, imipenem, amikacina y linezolid. Se observan tasas de resistencia de hasta el 70% para amoxicilina/ácido clavulánico, eritromicina, minociclina y ciprofloxacina, y < 5% para cefotaxima, imipenem, amikacina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol y linezolid. El 6,0% de las cepas de *N. cyriacigeorgica* incluidas no mostraron un patrón de sensibilidad VI típico [Valdezate, 2017].

N. nova: La sensibilidad descrita para *N. nova*, que se asocia con el patrón de susceptibilidad III, solo corresponde a *N. nova sensu stricto* y no a otros miembros del complejo *N. nova* (*N. africana*, *N. elegans*, *N. kruczakiae* y *N. veterana*). Las principales características del patrón de drogas III son la resistencia a la amoxicilina / clavulanámico y la sensibilidad frente a ampicilina, ceftriaxona, imipenem, amikacina, eritromicina, claritromicina y linezolid. En las cepas españolas esta especie se mostró muy resistente a la ciprofloxacina y la minociclina (90%) y resistente a amoxicilina/ácido clavulánico y tobramicina (68% y 48%, respectivamente). Se registraron bajas tasas de resistencia con respecto a cefotaxima y trimetoprim/sulfametoxazol (25% y 19%, respectivamente) y fue sensible a imipenem, amikacina, eritromicina y linezolid (< 5%). El 29% de las cepas mostró fenotipos diferentes con respecto al estándar para el patrón de sensibilidad III [Valdezate, 2017].

N. abscessus: Esta especie presenta el patrón de sensibilidad I, es decir, resistencia a ciprofloxacino y claritromicina, y resistencia frecuente a imipenem, pero sensible a los demás agentes antibióticos. Las cepas de nuestro país mostraron una tasa de resistencia a ciprofloxacino de 84%, un 49% con respecto a eritromicina y entre 0-9% a los agentes restantes. Se observan cepas un comportamiento diferente al descrito por el patrón I [Valdezate, 2017].

N. farcinica: con patrón de sensibilidad tipo V, presenta resistencia a ampicilina, cefalosporinas de amplio espectro, claritromicina y aminoglicósidos (excepto amikacina) y sensible a imipenem, ciprofloxacino y linezolid. Las cepas presentaron altas tasas de resistencia (90%) frente a tobramicina, claritromicina y minociclina, tasas intermedias (50%) con respecto a cefotaxima, ciprofloxacino y trimetoprima / sulfametoxazol, y tasas bajas (18%) con respecto a amoxicilina / ácido clavulánico, amikacina, imipenem y linezolid (en este caso, 3%). El 52% de las cepas diferían con respecto al patrón de sensibilidad V estándar en su susceptibilidad a imipenem, amikacina, ciprofloxacina y linezolid [Valdezate, 2017].

***N. carneae* (patrón no asignado, NA), *N. brasiliensis* [VIII], *N. otitidiscaviarum* [VII], *N. flavorosea* (NA), *N. rhamnosiphila* (NA), y *N. transvalensis* [IV]** completan las diez especies más frecuentes en España [Valdezate, 2017]. En las cepas españolas estudiadas, las tasas de resistencia para amoxicilina/ácido clavulánico pueden variar desde el 25% en *N. carneae* y *N. rhamnosiphila* a 60% en *N. flavorosea* y 90% en *N. otitidiscaviarum*. Estas especies han mostrado menor resistencia con respecto a

cefotaxima, a excepción de *N. otitidiscaviarum*, con una tasa del 100%. Imipenem fue el antibiótico menos activo contra *N. otitidiscaviarum*, *N. brasiliensis* y *N. transvalensis* (80%, 50% y 20%, respectivamente), pero más activo (< 3,5%) contra las tres especies restantes. Amikacina y tobramicina son muy activas frente a estas especies, excepto frente a *N. transvalensis*, con tasas de resistencia cercanas al 50% y 100%, respectivamente. Pocas cepas pertenecientes a estas especies fueron sensibles a minociclina, con tasas de resistencia entre 60% – 80%. Se observan resultados similares con respecto a eritromicina, siendo *N. flavoseosea* la especie más sensible. Solo *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* registran altas tasas de resistencia a ciprofloxacina (60% y 40%, respectivamente). Con respecto a trimetoprim / sulfametoxazol se observan tasas de resistencia más altas para las cepas de *N. carnea*, *N. flavoseosea* y *N. transvalensis* (30% – 40%). Todas las cepas de estas especies fueron sensibles a linezolid [Valdezate, 2017].

5.4 Resistencias descritas a estos antibióticos

Los mecanismos de resistencia antibiótica pueden ser intrínsecos o adquiridos, principalmente por la presión selectiva del ambiente. Se pueden adquirir a través de mutaciones en genes preexistentes o por la captura de elementos móviles por transferencia horizontal. Implica cambios en la permeabilidad de la pared bacteriana a agentes antibióticos, la pérdida de sus principales dianas, el aumento en la expresión de las bombas de flujo o la inactivación de enzimas [Cantón, 2009]. La presencia de determinantes de resistencia en el suelo y medio ambiente supone un riesgo para la salud global (concepto *One Health*, una sola salud), por su propagación a nuevos hospedadores a través de elementos genéticos móviles (fagos, plásmidos, transposones) [Peterson, 2018].

Hasta el momento actual, se han identificado determinantes de resistencia en aislamientos de *Nocardia* spp., como son los relacionados con la resistencia a betalactámicos (FAR- 1, AST-1, VIM-2, *bla*TEM-1, *bla*Z, aminoglicósidos (*aph*(3')-IIIa, macrólidos (*ermA*, *ermB*, *mefA* y *msrD*), tetraciclinas (*tetO*, *tetM*, y *tetL*), sulfamidas (*sulI*), trimetoprim (*df*rAS1), fluorquinolonas (*gyrA*) [Valdezate, 2015].

Entre las resistencias con mayor repercusión clínica destacan:

Resistencia a betalactámicos Se han descrito dos clases de β -lactamasas de clase A, FAR-1 y AST-1, en *N. farcinica* y *N. asteroides sensu stricto*. Ambas son similares en propiedades bioquímicas y composición aminoácídica, de lo que se deduce pueden derivar de un ancestro común [Laurent, 1999;

Poirel, 2001]. Aun así, la presencia de ambas no justifica el amplio perfil de resistencia mostrado frente a betalactámicos, pues se estima que el 90% de las cepas del género *Nocardia* contienen betalactamasas (<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/nocardia>).

Resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol Se han descrito mutaciones próximas al sitio activo de las dos enzimas que participan en la ruta de la biosíntesis de folatos: dihidrofolato reductasa (DHFR - *folA*) y dihidropteroato sintasa (DHPS - *folP*), responsables de la resistencia a trimetoprim y a las sulfamidas, respectivamente, con la detección de mutaciones en un homólogo de DHPS no descrito previamente (DHPS2 - *folP2*) [Mehta, 2020].

Resistencia a aminoglicósidos Los aminoglicósidos pueden ser inactivados por enzimas codificadas por genes presentes en el cromosoma, los plásmidos y otros elementos genéticos, como los que codifican la enzima AAC(6)-Ib (aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasa tipo Ib) [Ramirez, 2013]. Además, la metilación del ARNr 16S es un mecanismo de resistencia contra los aminoglicósidos, mediado por un grupo de metilasas similares a las producidas por las especies de actinomicetos productoras de aminoglicósidos. Los genes responsables se encuentran principalmente en los transposones dentro de los plásmidos transferibles, lo que les proporciona el potencial de propagarse horizontalmente y puede explicar en parte la distribución ya mundial de este nuevo mecanismo de resistencia. Se ha observado que algunos de estos organismos coproducen beta-lactamasas de amplio espectro o metalo-beta-lactamasas, contribuyendo a sus fenotipos multiresistentes [Doi, 2007].

Resistencia a fluorquinolonas De forma intrínseca, *Nocardia* spp. presenta baja sensibilidad a fluoroquinolonas. La única diana de este antibiótico es la ADN-girasa y sus subunidades GyrA/GyrB, pues no se identifica topoisomerasa IV en el género *Nocardia*. La interacción ADN-Girasa/fluoroquinolona implica regiones conservadas. Mutaciones en puntos específicos de las zonas QRDR (*quinolone-resistant-determining-regions*), generan resistencia adquirida a estos antibióticos. En el caso de la resistencia adquirida en *Nocardia* spp. se correlaciona con la presencia del residuo Ala-83 en GyrA, que difiere del residuo Ser-83 en las especies con perfil antimicrobiano o “patrón de drogas” sensible a ciprofloxacina [Valdezate, 2019, no publicado].

6. Síntesis de compuestos bioactivos en *Nocardia* spp.

El género *Nocardia* se encuentra abundantemente distribuido en el suelo, compartiendo nicho con otros actinomicetes. Los integrantes de este orden producen aproximadamente las dos terceras partes de los antibióticos naturales conocidos [Barka, 2016]. Se cree que estos productos naturales son metabolitos secundarios que puede apoyar la supervivencia del microorganismo productor porque actúa como "arma de defensa" directa contra otros microorganismos. Estas moléculas ayudan a defenderse tanto entre especies como entre organismos de la misma especie o proporciona una ventaja en la adquisición de nutrientes [Dahkal, 2019]. Dentro del orden de los actinomicetes se encuentra también el género *Streptomyces*, conocido como el principal productor de metabolitos secundarios.

Los policétido sintasa tipo I (PKS-I) y los grupos de genes de péptido sintetasa no ribosómicos (NRPS) son dos de los principales grupos de metabolitos secundarios producidos en las bacterias y están involucrados en la biosíntesis de cadenas de policétidos y de péptidos no ribosómicos, respectivamente. Estos genes son precursores de distintos medicamentos y compuestos de gran importancia industrial, como avermectina, eritromicina y vancomicina [Komaki, 2014]. Respecto al género *Nocardia*, las especies patógenas han demostrado ser más activas que las no patógenas como productoras de metabolitos secundarios [Luo, 2014], debido a que las interacciones microbianas estimulan la producción de antibióticos [Netzker, 2018]. Se cree que el comportamiento patogénico está asociado con mecanismos de competencia con sus anfitriones, lo que a su vez activa ciertas vías metabólicas que no están presentes en las especies no patógenas [Luo, 2013].

En las dos últimas décadas se ha hecho evidente que este género posee un tremendo potencial biotecnológico y farmacéutico, con especies que producen numerosas enzimas y pequeñas moléculas estructuralmente novedosas y altamente bioactivas. Esto lo confirma el análisis y disponibilidad de un número cada vez mayor de secuencias genómicas de *Nocardia*. En general, los genomas de las cepas de *Nocardia* spp. comprenden de 16 a 49 grupos de genes biosintéticos, razón por la cual las cepas de *Nocardia* spp. son consideradas productoras con "alto talento biosintético" [Chen, 2020].

La secuenciación de genomas bacterianos está permitiendo, mediante la anotación y el escaneo automatizado con plataformas como AntiSMASH y MIBiG, el estudio de las rutas biosintéticas de productos naturales por minería genómica y el descubrimiento continuo de grupos de genes de metabolitos secundarios.

Mediante programas bioinformáticos de acceso libre (Prokka, RAST, Prodigal...) se ha observado que los genomas de las cepas de *Nocardia* transportan tantos grupos de PKS-I y NRPS como las cepas de *Streptomyces*. Además, el número de grupos de genes de PKS-I y NRPS en las cepas de *Nocardia* varía sustancialmente según las especies, siendo las cepas de *N. brasiliensis* las que presentan el mayor número de grupos de PKS-I y NRPS. Se ha observado que diferentes cepas de *N. brasiliensis* presentan grupos específicos de genes para la síntesis de metabolitos secundarios, incluso dentro de la misma especie. No se observa una relación clara entre el tamaño del genoma y la patogenicidad en *Nocardia*.

Las cepas de *Nocardia* constituyen un recurso muy prometedor para el descubrimiento de metabolitos secundarios [Komaki, 2014]. En el Anexo VI se compilan los principales compuestos bioactivos aislados en cepas de *Nocardia* spp.

Las moléculas más destacadas por su actividad son las siguientes:

- **Nocardicina:** Producido por *Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanensis*, es similar a todos los betalactámicos, las nocardicinas funcionan inhibiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los betalactámicos bicíclicos, la nocardicina A muestra resistencia a la betalactamasa, probablemente debido a la presencia de un anillo betalactámico monocíclico más estable en su estructura [Nishida, 1977].

-**Nocobactina:** Las cepas de *Nocardia* spp. producen sideróforos para facilitar la absorción de iones metálicos como el hierro, contribuyendo a su actividad citotóxica [Dhakal, 2019]. El genoma de *N. farcinica* tiene 14 genes NRPS y 7 PKS. Entre ellos, tres genes NRPS y dos genes PKS se presentan agrupados y participan en la biosíntesis de un sideróforo con alta homología a la micobactina, otro sideróforo producido por *Mycobacterium tuberculosis* [Hoshino, 2011]. Recientemente se ha descrito un nuevo derivado de nocobactina con actividad antimuscarínica, la terpenibactinas A – C [Chen, 2020].

-Nocarditiocina: Tiopéptido producido por *Nocardia pseudobrasiliensis* con actividad defensiva contra las bacterias ácido-resistentes, incluidos los patógenos clínicos, tales como *M. tuberculosis*, tanto para cepas sensibles como resistentes a rifampicina [Mukai, 2009].

-Nargenicina: Pertenece al grupo de policétidos alicíclicos y lo producen *Nocardia argentinensis* y otras cepas de *Nocardia* spp. Es efectivo contra bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Posee una actividad más potente y una citotoxicidad más baja que los medicamentos empleados comúnmente para su tratamiento, como la eritromicina, la espiramicina y la vancomicina [Sohng, 2008].

-Brasilicardina: Hay varios tipos y todos han sido aislados en *Nocardia terpenica* IFM 0406 (previamente nombrada como *N. brasiliensis*). Las pruebas en ratones demostraron, ya a finales del siglo pasado, la gran actividad inmunosupresora de la brasilicardina A contra la proliferación de la respuesta de los linfocitos del hospedador cuando son estimulados por un antígeno [Komaki, 1999]. Este organismo es además productor de la lipolantina antiestafilocócica nocavionina y de brasilinólidos antimicóticos. Recientemente se ha secuenciado su genoma desvelando la presencia de un grupo de genes que codifica un nuevo compuesto similar a la nocobactina [Chen, 2020].

7. Aplicación de la secuenciación masiva con fines taxonómicos en cepas de *Nocardia* spp.

7.1. Fundamento

Estas nuevas técnicas, englobadas dentro del término *High-Throughput Sequencing* (HTS) o *whole genome sequence* (WGS) permiten la lectura de un gran número de secuencias en paralelo aumentando los resultados obtenidos por encima del máximo anterior proporcionado por Sanger de 96 secuencias en cada corrida donde es común encontrar errores en un porcentaje de aproximadamente el 0,1%. Para superar estas limitaciones se ha ideado la secuenciación de grandes moléculas de ADN basándose en la técnica de secuenciación al azar (*shotgun sequencing*), donde el ADN a secuenciar se rompe de forma aleatoria en fragmentos más pequeños. La secuenciación de estos amplicones permite la “multiplexación” o secuenciación simultánea de muchas muestras añadiendo a cada amplicón una etiqueta para poder identificarlo, creando así una librería de secuencias que constituirán el genoma. Este genoma se puede ensamblar *de novo*, es decir, sin conocer la especie o género que se estudia, o por comparación con un patrón, como un genoma de referencia. En un principio, la aplicación de estas técnicas era limitada debido a su elevado coste, pero con la internacionalización y el desarrollo de nuevas plataformas, ahora es una técnica mucho más asequible (<http://www.genome.gov/sequencingcostsdata>).

En 1998 se secuenció por WGS la primera cepa de actinomicete. Se trataba de una cepa de la especie *Mycobacterium tuberculosis* [Cole, 1998]. No fue hasta 2004 cuando Ishikawa y colaboradores publicaron el genoma completo de la primera cepa de *Nocardia* spp., *N. farcinica* IFM10152 [Ishikawa, 2004]. En ella se describen un cromosoma circular de 6.021.225 pb y dos plásmidos, de 184.027 pb y 87.093 pb cada uno. Posteriormente se han publicado los genomas completos de *N. cyriacigeorigica* GUH-2 [Zoropogui, 2012] y *N. brasiliensis* HUJEG-1 [Vera-Cabrera, 2012], hasta alcanzar los 395 genomas publicados en la actualidad (fecha de acceso: 11/07/2020). La aplicación de estas técnicas de WGS a cepas de actinomicetales es complicada, debido al alto contenido en G+C de la secuencia y la estructura de la pared bacteriana, que dificulta su extracción cromosómica, a que son microorganismos

de crecimiento lento, y a la división de la carga genómica entre un cromosoma lineal y los plásmidos [Gomez-Escribano, 2016].

7.2. Etapas del proceso

Cada plataforma WGS tiene diferentes características, pero el esquema principal de trabajo, que es similar, incluye los siguientes pasos:



Figura 17 Diagrama de flujo de secuenciación masiva del genoma procariota. Tomada de Zoni Matta y colaboradores [Zoni Matta, 2015]

1. Preparación de librerías: Una librería es una serie de fragmentos de ADN o ARN a cuyos extremos se une mediante ligasas una pareja de oligonucleótidos marcadores característicos de cada tecnología de secuenciación comercializada, llamados adaptadores. El oligonucleótido unido a los fragmentos incluye además del adaptador una secuencia identificativa de cada muestra (10-12 pb), que permite su unión a la base sólida o en emulsión de las distintas plataformas para la amplificación. Dicho paso se puede realizar de forma manual o automatizada.

2. Amplificación clonal: Se aísla cada uno de los fragmentos de la librería y se realizan copias para aumentar la señal que será registrada durante la secuenciación, llegando a la obtención de conjuntos o *clusters* de lecturas. En la tecnología Illumina® cada fragmento de la biblioteca es amplificado por una

PCR-puente, para generar un *cluster* retenido en el soporte sólido, que será el templado para el paso posterior. En el caso de las plataformas Ion Torrent® se lleva a cabo una PCR en emulsión con perlas para la amplificación clonal. Se llega así a la obtención de muchas copias para completar la secuencia de genoma completo, condicionando esto la cobertura obtenida.

La tecnología de *Complete Genomics* utilizada por el *Beijing Genomics Institute* (BGI) es actualmente el único método que lleva a cabo el enriquecimiento en solución con nanobolas. En este caso, el ADN sufre una ligadura mediante un proceso de circularización y escisión para crear una plantilla circular con cuatro regiones distintas para los adaptadores [Goodwin, 2016].

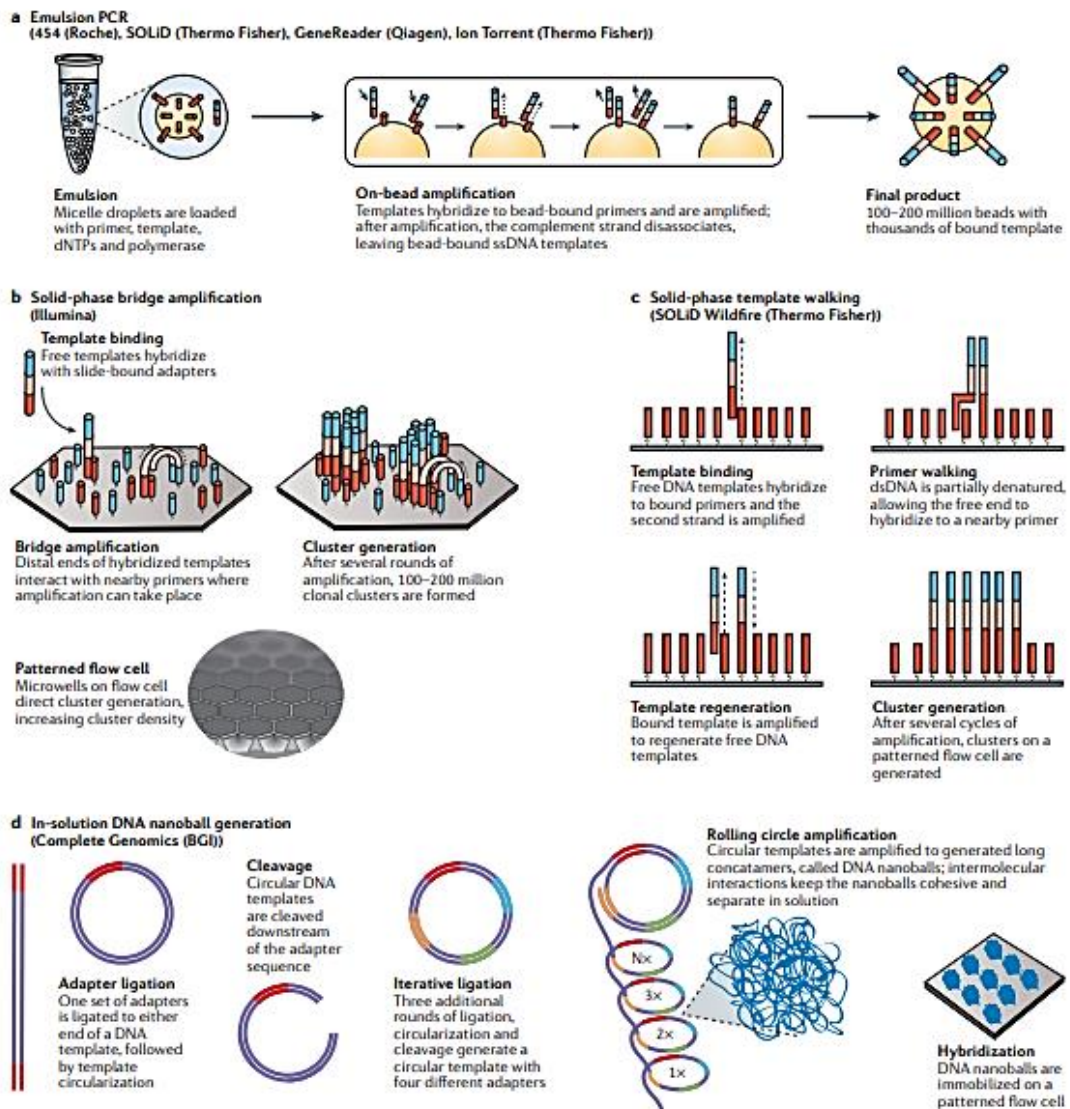


Figura 18 Técnicas para la elaboración de librerías según la plataforma empleada. Tomada de Goodwin, y colaboradores [Goodwin, 2016]

3. Secuenciación masiva paralela: Cada plataforma aplica una tecnología para la detección de la incorporación de cada nucleótido a la cadena (fluorescencia en nucleótidos o sondas marcados, quimioluminiscencia en los pirosecuenciadores, medida del cambio de pH producido por el protón liberado, etc.). El sistema Illumina®, uno de los sistemas más utilizados en nuestro país, llega a la secuenciación por adición de nucleótidos terminadores reversibles, donde en cada ciclo los nucleótidos terminadores marcados con fluorescencia compiten para elongar la cadena, añadiendo solo un nucleótido por ciclo. El nucleótido incorporado es excitado y su emisión lumínica, registrada. Luego, el fluoróforo y el terminador se eliminan y se repiten los ciclos. Esta secuenciación se realiza en ambos sentidos, dando lecturas de tanto en un solo sentido (*single-end reads*) como de extremos pareados (*paired-end reads*).

4. Análisis de las medidas y resultados: El número y tamaño de datos obtenidos es ingente y son necesarios equipos informáticos de alta capacidad para su procesamiento. De los pasos anteriores se obtienen las lecturas (*reads*) en forma de archivo FASTQ asociado a un valor de calidad. Este archivo contiene las estadísticas básicas (nombre del archivo, tipo de archivo, codificación), el número total de secuencias procesadas (real y estimado) y filtradas, la longitud de las secuencias (longitud de la secuencia más corta y la más larga), el % de G+C y la calidad de la secuencia por base, entre otros.

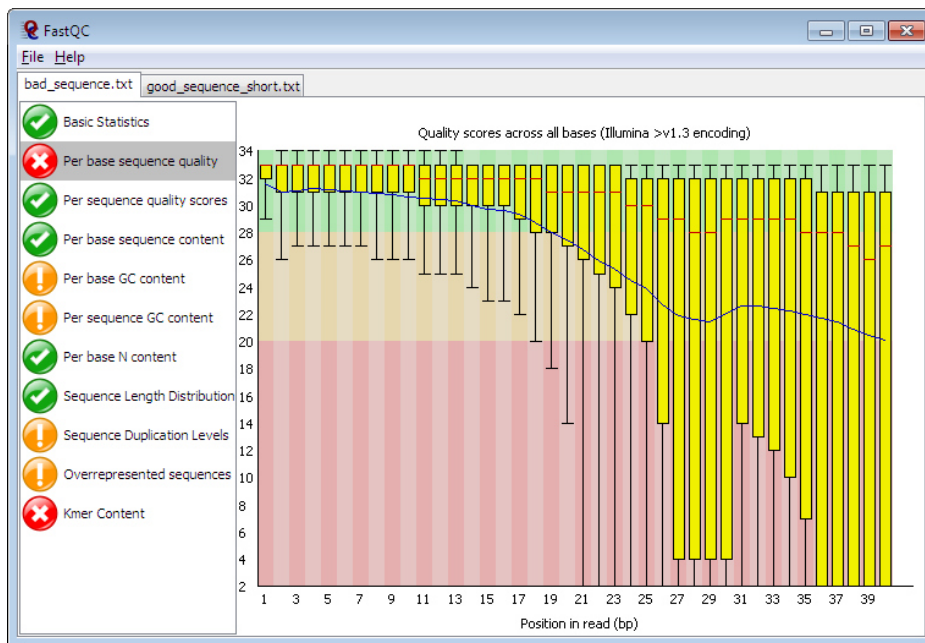


Figura 19 Gráfico de calidad de los datos de Illumina. Tomado de <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Posteriormente se lleva a cabo el preprocesamiento de las muestras. Con el programa Trimmomatic v0.33 se pueden eliminar los restos de *barcodes* y *primers*, y filtrar las secuencias basándose en su calidad [Bolger, 2014].

El ensamblado *de novo* para células procariontas se puede realizar con el programa SPAdes. La versión 3.14.0 de SPAdes admite lecturas de extremos pareados, pares de pares y lecturas de extremos no pareados, tomando datos de varias bibliotecas. Se diseñó inicialmente para genomas pequeños, bacterias, hongos y otros genomas. Se ha modificado el programa para genomas mayores y de organismos diploides (dipSPAdes, exSPAnDer, cloudSPAdes...) [Bankevich, 2012].

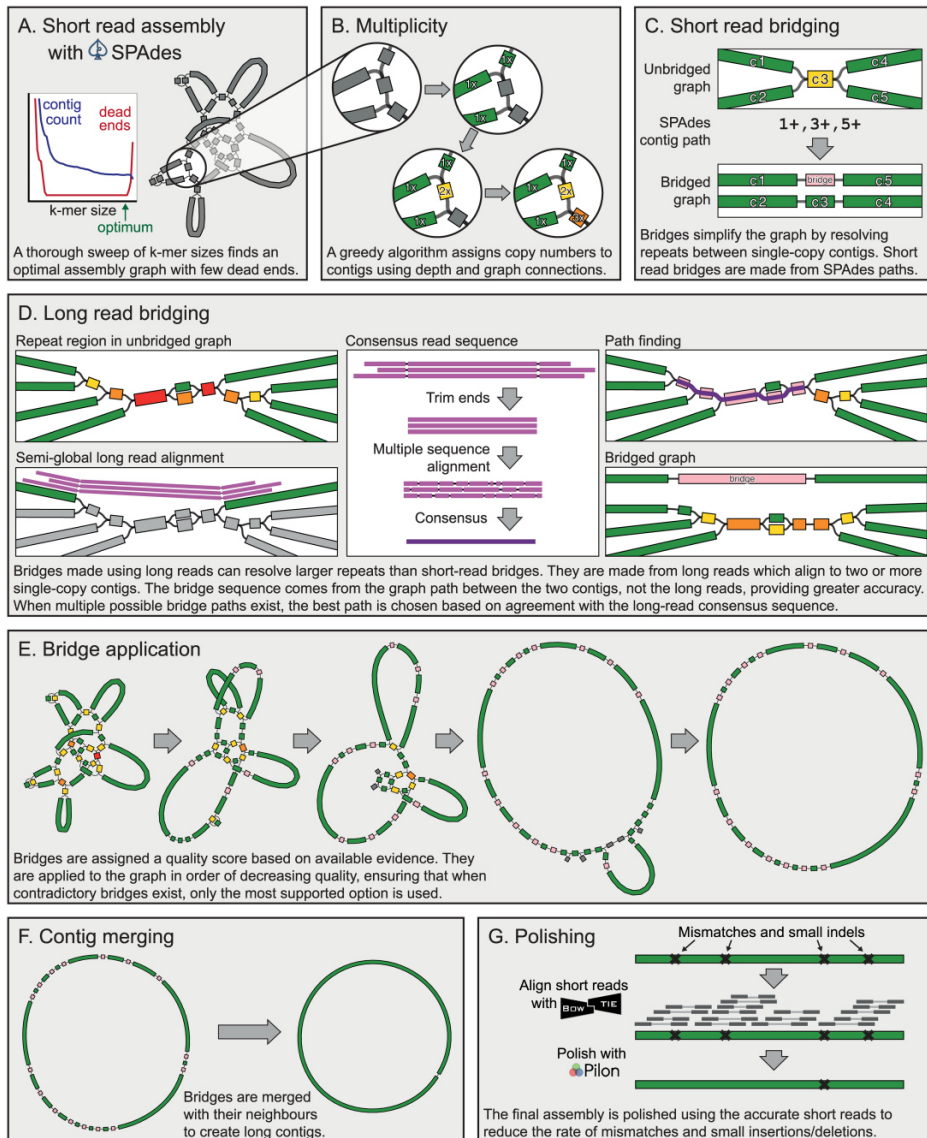


Figura 20 Pasos del pipeline de Unicycler. Tomada de Wick y colaboradores [Wick, 2017]

Este programa ha sido superado por Unicycler, de código abierto (<http://github.com/rrwick/Unicycler>). Se emplea para ensamblar genomas bacterianos a partir de lecturas tanto cortas como largas, que produce ensamblajes precisos, completos y rentables. Unicycler crea un gráfico de ensamblaje inicial a partir de lecturas cortas utilizando el ensamblador *de novo* SPAdes y después simplifica este gráfico utilizando información de las lecturas cortas y largas. Unicycler añade además un nuevo método alineador para añadir las lecturas largas. Unicycler puede ensamblar *contigs* de mayor tamaño con menos interrupciones que otros ensambladores, incluso cuando la profundidad de lectura es grande y la precisión, baja [Wick, 2017].

De estas lecturas ensambladas se obtienen *contigs* (fragmentos de menor tamaño), o *scaffolds* (de mayor tamaño). Este ensamblado se somete de nuevo a un control de calidad. Por ejemplo, el programa QUAST de acceso abierto, elimina de lecturas de baja calidad y mejora el ensamblaje obtenido, pudiendo evaluar respecto a un genoma de referencia, o no contar con él [Gurevich, 2013].

Con estos datos se pasa a la *Variant Call Format* o llamada a variantes. La identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) entre aislados es el análisis más comúnmente realizado con los datos de secuenciación WGS. Es muy útil cuando se analizan aislados estrechamente relacionados, en las investigaciones de brotes, ... Por lo tanto, el rendimiento de los métodos de llamada SNP tiene un efecto significativo en la precisión de los análisis posteriores, como la inferencia de árbol filogenético [Yoshimura, 2019]. Para ello se mapean las lecturas directamente contra un genoma de referencia de la misma especie utilizando diferentes softwares como SMALT (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/smalt-0>), Bowtie30 o BWA33. El archivo resultante es del tipo SAM (Sequence Alignment Map) y debe ser manipulado con Samtools, VarScan o GATK para generar un archivo Variant Calling File (VCF) de comparación [Hernández, 2019]. Los archivos tipo SAM, BAM o VCF se pueden visualizar con programas como Artemis o IGV, de código abierto y escritos en Java, que pueden ejecutarse en cualquier plataforma Java como Macintosh y Windows [Carvet, 2005].

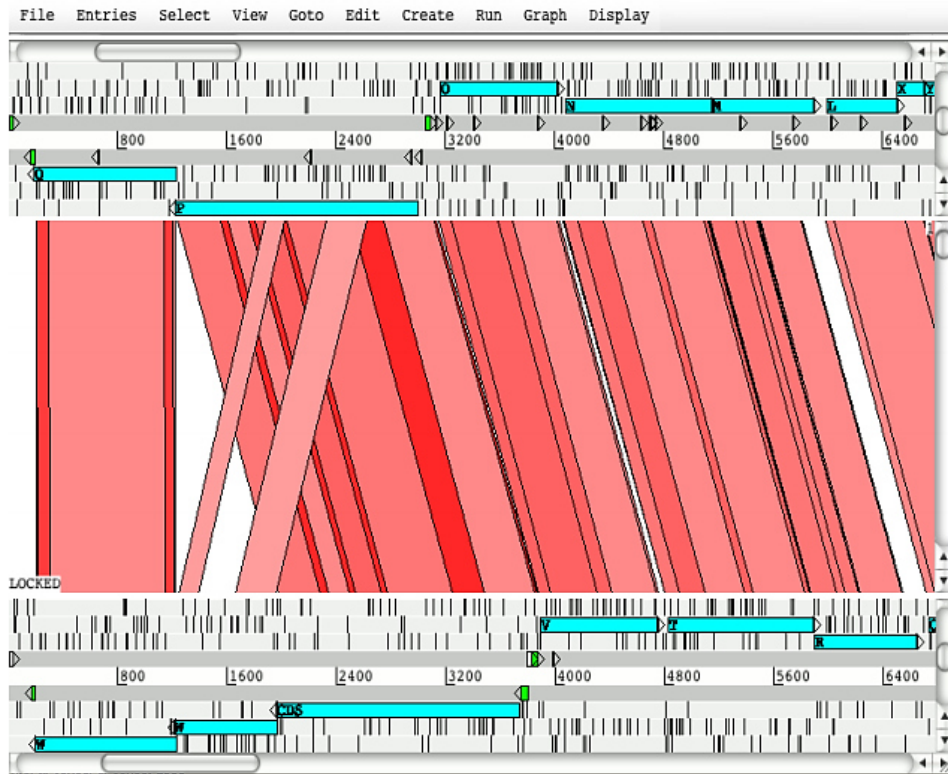


Figura 21 Gráfico de ACT Artemis. Tomado de <https://www.sanger.ac.uk/tool/artemis-comparison-tool-act/>

Para la posterior anotación del genoma, es decir, la búsqueda de estructuras funcionales, se pueden emplear programas como Prokka. La forma más empleada de predecir lo que un gen codifica es compararlo con una gran base de datos de secuencias conocidas, generalmente a nivel de secuencia de proteínas, y buscar la anotación que mejor coincida. Prokka utiliza este método, pero de manera jerárquica, comenzando con una base de datos más pequeña, pasando a bases de datos de tamaño medio pero específicas del dominio de esa especie, y finalmente a los modelos de proteína de esa familia. Así un genoma típico de 4 Mbp se puede anotar completamente en menos de 10 minutos. Produce archivos GFF3, GBK y SQN que están listos para ser editados por Sequin y finalmente ser enviados a Genbank, DDJB o ENA para su publicación y posteriores consultas [Seeman, 2014].

7.3. Plataformas disponibles

El primer secuenciador de WGS puesto en el mercado fue el equipo GS20 de 454 Life Sciences®, comercializado en 2005. Se basa en la pirosecuenciación, descrita en 1985 por Nyrén y Lundin, que añade

los nucleótidos a la cadena mediante métodos enzimáticos, liberando así pirofosfato inorgánico, y cuantificando la señal luminosa emitida [Nyrén, 1985]. Realiza la amplificación clonal de la biblioteca con una PCR en emulsión, y de este templado mide las emisiones luminosas al añadir los nucleótidos. Esta técnica permitió secuenciar 25 millones de bases, con una precisión del 99% en una corrida de 4 horas. En este primer artículo se publicó la secuenciación *de novo* del genoma de *Mycoplasma genitalium* llegando a cubrir el 96% del genoma con una precisión de 99,96% [Margulies, 2005]. Fue posteriormente adquirida por Roche® y ya no se producen unidades. Posteriormente, y diferentes tecnologías y modernización de estas han ido surgiendo diferentes plataformas de secuenciación, como indican la tabla 7 y la figura 22.

En 2006 salió al mercado la tecnología de Solexa®, posteriormente Illumina®, y su primer equipo GAII, que emplea nucleótidos terminadores marcados con moléculas fluorescentes, al igual que en la secuenciación de terminadores de Sanger, pero permitiendo la eliminación de la fluorescencia y desbloqueando el carbono 3' para aceptar nuevas bases y continuar la secuenciación. Las longitudes obtenidas son menores que por pirosecuenciación, pero analiza en paralelo hasta 250 millones de secuencias, haciendo posible obtener hasta 6×10^{12} lecturas en una sola corrida [Goodwin, 2016]. Se considera este secuenciador como el más adecuado para determinaciones microbiológicas, ya que es el único secuenciador de mesa que proporciona resultados de hasta 600 pb, con *paired-end sequencing* y exactitud de lectura de más del 99,9% [Hernández, 2020]. Esta plataforma ha sido la empleada en los artículos que conforman esta tesis doctoral.

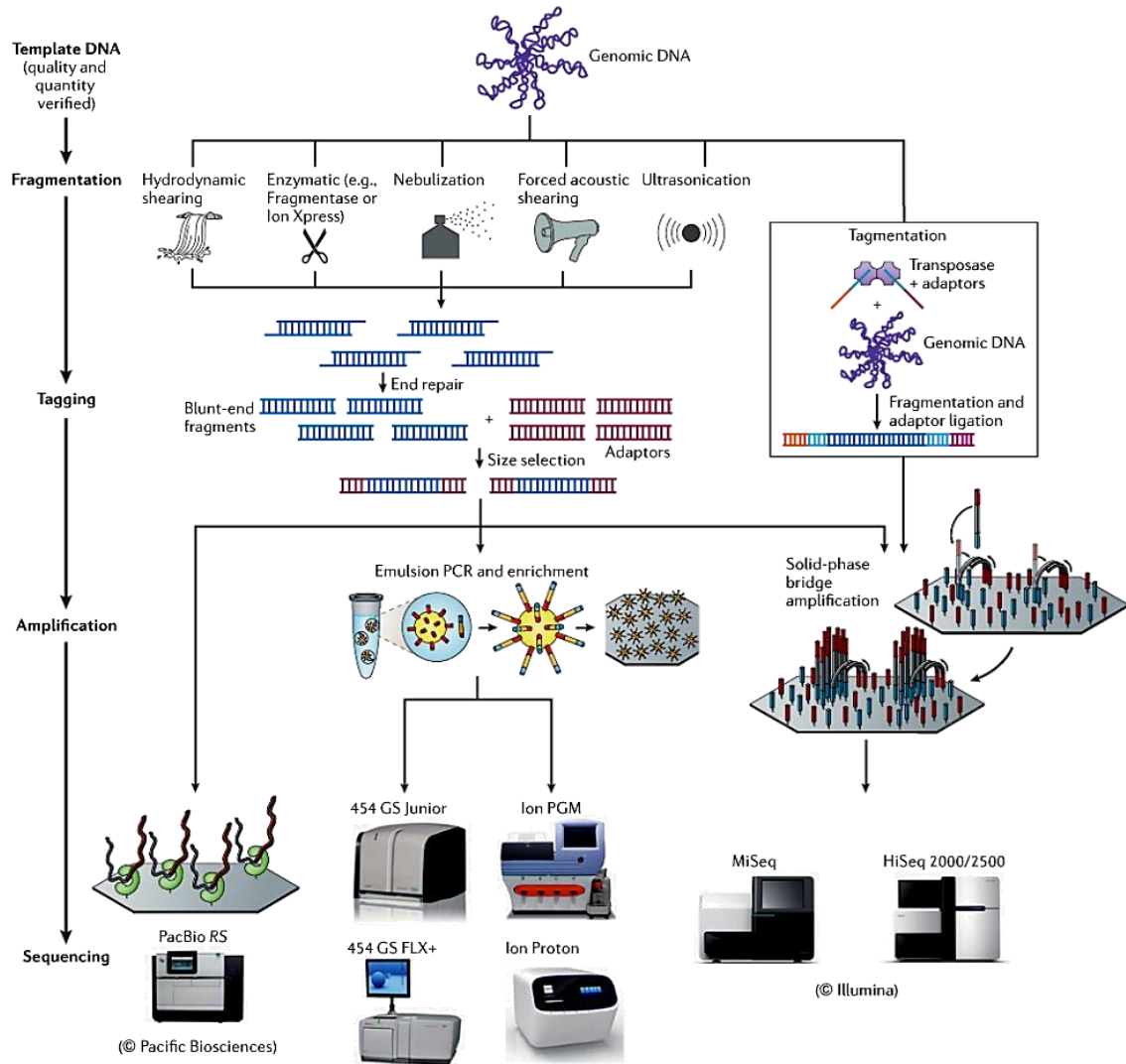


Figura 22 Proceso de secuenciación masiva y distintas plataformas disponibles. Tomado de www.uco.es

Las tecnologías posteriores se consideran de tercera generación (TGS). Presenta varias ventajas, pues se realiza la secuenciación de moléculas individuales en un paso previo sin amplificación, y en tiempo real (sin ciclos de polimerización / terminación), siendo capaces de proporcionar longitudes de lectura de varias kilobases. Destacan dos métodos:

(1) **Single Molecule Real Time (SMRT)** (por Pacific Biosciences of California, Inc.®) generalmente conocida como "PacBio". La secuenciación se realiza sobre un chip con muchas guías de onda "modo cero" (ZMW). Son cavidades circulares recubierta de una película de aluminio sobre un

sustrato de sílice que contienen nanofotones. En cada ZMW se encuentra fija una ADN polimerasa activa y una molécula de ADN molde de cadena sencilla. Por sus medidas permite monitorizar la actividad de la ADN polimerasa y la señal que se produce al incorporar los nucleótidos se detecta durante la misma síntesis de ADN, considerándose así una secuenciación a tiempo real [Eid, 2009]. PacBio RS (el primer secuenciador lanzado por PacBio) tiene varias ventajas: la preparación de la muestra es muy rápida (de 4 a 6 horas), no necesita un paso de PCR en la preparación, lo que reduce el sesgo y el error, la tasa de rotación es bastante rápida y las carreras se realizan en un día. Además, la longitud promedio de lectura es 1.300 pb, más largo que el de cualquier tecnología de segunda generación [Liu, 2012].

(2) **ADN Nanopore** (por Oxford Nanopore Technologies Ltd.®): Han comercializado varios equipos. El primer producto, MinION, se presentó en 2014 y se puso a la venta en 2015. El GridION ampliado se lanzó comercialmente en 2017 y PromethION en 2018 (<https://nanoporetech.com/about-us/history>). Los primeros informes indican que esta tecnología, a pesar de su precisión de lectura por debajo del 70%, ya es útil para obtener *scaffolds*, gracias a las lecturas de entre 1-98 kb. Sin embargo, la aplicación a la secuenciación del genoma de actinobacterias todavía no da buenos resultados debido a su alto contenido en G+C [Gomez-Escribano, 2016].

Tabla 7 Resumen de las principales tecnologías de WGS y TGS. Tomado de Hernández y colaboradores [Hernández, 2020]

Secuenciador	Compañía	Año ^a	Química	Máxima longitud de lectura (pb)	Máx. rendimiento/carrera	Ratio de error (%)	Máx. n.º de secuencias/carrera
454 GS FLX	Roche	2004	Pirosecuenciación-emulsión	700-800	0,7 Gb	1	5×10^5
Genome Analyzer GA	Solexa	2006	Síntesis-terminadores- <i>clusters</i>	2×100	1 Gb	~0,1	1×10^8
SOLiD®	Life Technologies	2007	Ligación-emulsión	75+35	150 Gb	~5	1.400×10^6
Ion Torrent PGM™	Life Technologies	2010	Síntesis-emulsión-detección protones	200-400	2 Gb	~1	$0,4-5,5 \times 10^6$
Proton™	Life Technologies	2012	Síntesis-emulsión-detección protones	200	10 Gb	~1	$60-80 \times 10^6$
PacBio®	Pacific Biosciences	2010	SMRT	6-	3 Gb/día	~13	370.000×10^6

Secuenciador	Compañía	Año ^a	Química	Máxima longitud de lectura (pb)	Máx. rendimiento/carrera	Ratio de error (%)	Máx. n.º de secuencias/carrera
HiSeq	Illumina	2010	Síntesis-terminadores- <i>clusters</i>	2 × 150	1.500 G _b	~0,1	5.000 × 10 ⁶
MiSeq	Illumina	2011	Síntesis-terminadores- <i>clusters</i>	2 × 300	15 Gb	~0,1	25 × 10 ⁶
Nextseq	Illumina	2014	Síntesis-terminadores- <i>clusters</i>	2 × 150	120 Gb	~0,1	260 × 10 ⁶
Novaseq	Illumina	2017	Síntesis-terminadores- <i>clusters</i>	2 × 250	4.800-6.000 G _b	~0,1	20.000 × 10 ⁶
MinION™	Oxford Nanopore	2014	SMRT	300 kb	42 Gb	≥ 4	4,4 × 10 ⁶

7.4. Aplicaciones

Las técnicas de WGS se han convertido en el nuevo paradigma en la taxonomía bacteriana con la identificación de especies, la descripción de nuevos géneros y de nuevas especies y la identificación de genes que codifican para la virulencia, resistencia, y la síntesis de biocompuestos y otros elementos. A partir de los datos de secuenciación WGS se pueden obtener resultados por métodos bioinformáticos, encontrándose diversas plataformas de acceso libre que facilitan este estudio. En el Anexo VI se muestra un resumen de las más destacadas.

7.4.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE WGS

Su empleo se propuso en 2005 por Konstantinidis y Tiedjem, pero en 2007 fue modificado por Goris y colaboradores [Konstantinidis, 2005; Goris, 2007]. Está basado principalmente en la comparación de genomas a través de BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Este programa compara fragmentos de genomas de 1.020 nucleótidos frente a todos los fragmentos de genoma disponibles de longitud similar. Otro algoritmo de comparación es MUMmer, que alinea rápidamente genomas completos, ya sea en forma completa o tipo borrador o *draft*. MUMmer también puede alinear genomas

incompletos; puede manejar fácilmente los cientos o miles de fragmentos o *contigs* de un proyecto *shootgun*, y los alinearán con otro conjunto de *contigs* o un genoma usando el programa NUCmer [Delcher, 2003].

A partir de los datos obtenidos por WGS se puede llegar a una identificación de la especie estudiada de forma más acertada y fiable que por la secuenciación de ARNr 16S. Por ejemplo, en especies del género *Streptomyces* spp. no es posible la identificación a nivel de especie a partir de la comparación de secuencias de ARNr 16S y es necesario la aplicación de técnicas complementarias [Kim, 2012]. Además, el ADN ribosomal puede estar presente en múltiples copias en cada genoma y la variabilidad intragenómica es posible [Arkebrand, 2016]. Se establecen algoritmos para la identificación basada en los datos del genoma completo, como el que se indica en la figura 23.

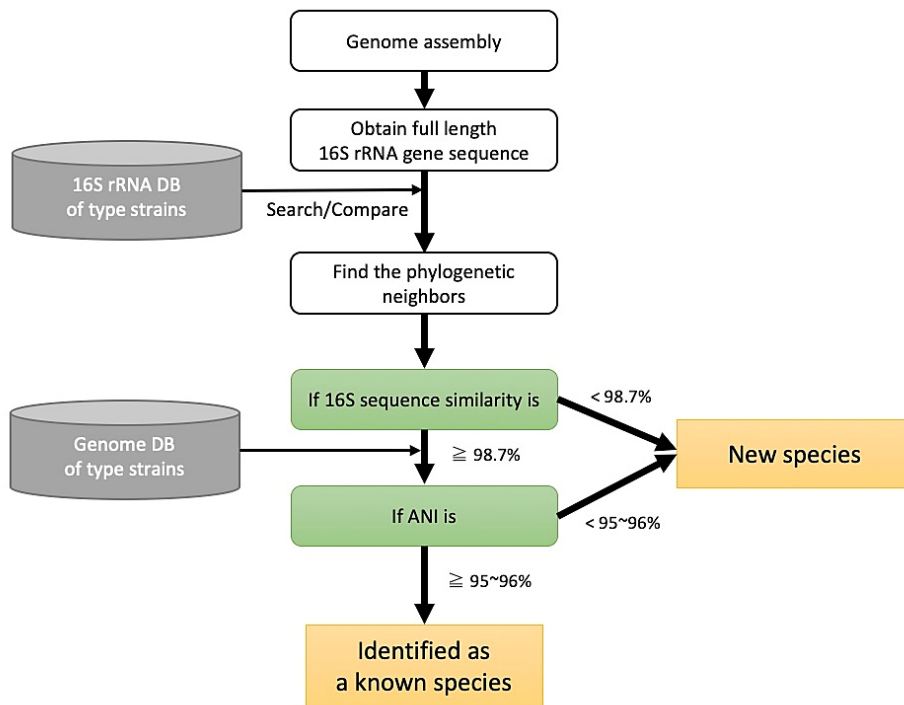


Figura 23: Flujo de la identificación taxonómica y la asignación de nuevas especies basada en la secuencia del gen ARNr 16S y el genoma completo. Tomada de <https://help.ezbiocloud.net/user-guide/truebac-id/bacterial-identification-101/>

Para considerar que una cepa de bacteria procariota pertenece a una especie concreta, esta debe cumplir los siguientes parámetros:

- **Average nucleotide identity (ANI):** Este análisis computacional estima la identidad promedio de nucleótidos entre el genoma problema y el de referencia utilizando tanto los mejores resultados (ANI unidireccional) como los mejores resultados recíprocos (ANI bidireccional). El cálculo de ANI implica la fragmentación de la secuencia del genoma, seguido de la búsqueda de la secuencia de nucleótidos, el alineamiento y el cálculo de la identidad. El algoritmo original para calcular ANI utilizaba el programa BLAST como motor de búsqueda [Yoon, 2017]. Se ha desarrollado un algoritmo ANI mejorado, llamado OrthoANI, para acomodar el concepto de ortología, para lo cual ambas secuencias del genoma se fragmentan y solo se toman en cuenta los pares de fragmentos ortólogos para calcular las identidades de nucleótidos [Lee, 2016]. Por lo general, los valores de ANI entre genomas de la misma especie están por encima del 95%. Si los valores están por debajo del 75% se debe usar AAI en su lugar. Esta herramienta admite genomas completos y multi-*fasta* (*draft genome*). Se ha estudiado su correlación con la técnica de hibridación ADN-ADN (DDH), y un valor de 95% de ANI corresponde al valor aceptado de 70% en DDH [Roselló-Mora, 2015]. Disponible en <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>).

- **Average Amino Acid identity (AAI):** Similar al anterior, pero en lugar de archivos de ADN FASTA, el usuario debe suministrar al programa archivos FASTA de proteínas. El valor de corte estimado también es del >95%. Para poblaciones más distantes se debe usar AAI porque la resolución se pierde progresivamente a nivel de nucleótidos. El algoritmo empleado es USEARCH en este caso. Las descripciones de nuevas especies deben ir acompañadas de sus valores de relación ANI y/o AAI [Rodríguez, 2014]. Disponible en <http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>.

- **Genome to Genome Distance Calculator (GGDC):** Es un método para inferir distancias entre genomas completos capaz de imitar la hibridación ADN-ADN (DDH). Los valores calculados con GGDC producen una correlación algo mejor con los valores de DDH que los obtenidos por ANI. Se puede aplicar a genomas muy reducidos y regiones de secuencias repetitivas. También son útiles cuando la secuenciación del genoma ha sido incompleta. Se basa también en BLAST, pero usando la comparación de pares de secuencias con mayor valor (*high-scoring sequence pairs* o HSP). Permite inferir árboles filogenéticos a partir de las matrices de distancia utilizando técnicas estándar como *neighbour-joining* [Meier-Kolthoff, 2013]. Disponible en <http://ggcd.gbdp.org/>.

-Contenido en G+C: El contenido de G C de un genoma ha sido empleado con frecuencia en la descripción taxonómica de especies y géneros de procariotas a través de métodos convencionales e indirectos, que resultan lentos y complicados. Su cálculo basado en la secuenciación del genoma completo ha demostrado ser más certero que el obtenido a partir de HPLC [Kim, 2015]. Las diferencias de contenido de G+C calculado directamente a partir de las secuencias genómicas entre nuestra cepa problema y las cepas de referencia de las bases de datos se han comparado con las similitudes de hibridación ADN – ADN (DDH) calculadas *in silico* utilizando el servidor web GGDC, con un 70% de similitud como el umbral estándar de oro para los límites de especies. La variación de este valor dentro de una especie es como máximo 1% cuando se calcula a partir de secuencias del genoma [Meier-Kolthoff, 2014]. Si la variación en el contenido de G+C dentro de las especies bacterianas es del 3- 5% puede atribuirse a errores experimentales [Rosselló-Mora, 2015].

Partiendo de los coeficientes anteriores, para cada cepa se puede realizar la asignación de género/especie o a la descripción de un nuevo género bacteriano o de una nueva especie o su sospecha. Estos coeficientes se pueden obtener a través de las siguientes plataformas y servidores web:

-AAI profiler: un servidor web para el análisis y control de calidad en estudios de genética comparativa. AAI profiler resume los resultados de la búsqueda de secuencias de todo el proteoma para identificar especies nuevas, ya que determina la necesidad de reclasificación taxonómica y detecta muestras aisladas y contaminadas. El generador de perfiles AAI muestra los resultados utilizando un diagrama de dispersión que calcula la identidad promedio de aminoácidos (AAI) del proteoma problema respecto a todas las especies similares en la base de datos de secuencias. Se indican grupos taxonómicos por color y estilos de marcador, destacando los *outliners*. AAI-profiler utiliza SANSparallel para realizar búsquedas de homología de alto rendimiento. AAI-profiler es fácil de usar y muy intuitivo, dando el resultado en pocos minutos [Medlar, 2018]. Disponible en <http://ekhiADN2.biocenter.helsinki.fi/AAI>.

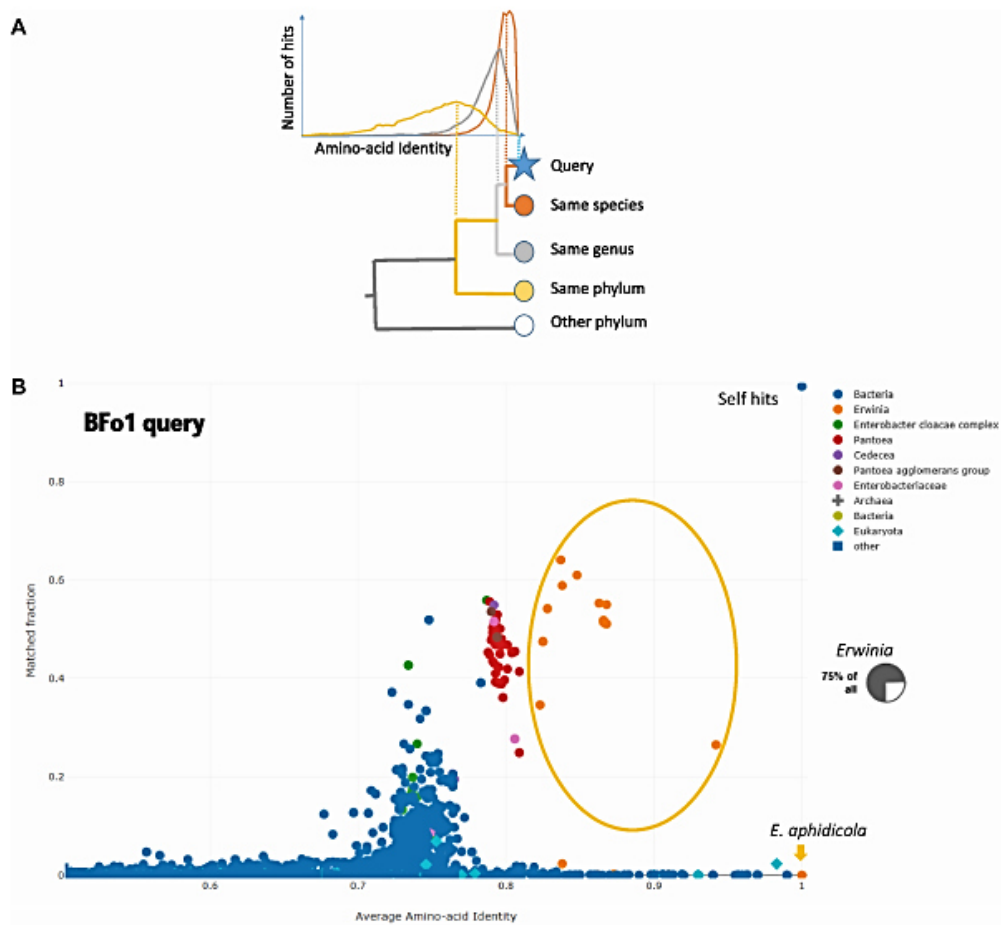


Figura 24 Gráficos obtenidos a partir de AAI-profiler. A) Gráfico de similitud a nivel de especie (naranja), nivel de género (gris) o nivel de phylum (amarillo). Las identidades de secuencia (Identidad de aminoácidos promedio, AAI) se correlacionan con la distancia taxonómica. (B) Diagrama de dispersión. Los géneros bacterianos seleccionados para la comparación se destacan por diferentes colores. El punto más cercano a las coordenadas (1,1) es la especie de consulta. Tomado de Medlar y colaboradores [Medlar, 2018].

-Ezbiocloud: Es una base de datos integrada, de acceso libre, que unifica la taxonomía basada en el gen ARNr 16S y las secuencias del genoma, y ofrece las herramientas bioinformáticas que acompañan a su análisis. Todos los genomas disponibles están identificados taxonómicamente a nivel de género, especie o subespecie utilizando una combinación de búsqueda basada en genes y OrthoANI. Contiene más de 62.000 genomas sometidos a filtros de calidad, de donde se generan informes completos del contenido de G+C, tamaño de genoma y otros datos de interés destacados de cada taxón [Yoon, 2017]. disponible en <http://www.ezbiocloud.net/>.

- **ID TrueBac** : Pertenece a ChunLab Inc. (Seúl, Corea), y en este caso se trata de una plataforma comercial, no de acceso libre. Destacan sus dos puntos fuertes: una base de datos patentada con secuencias de ARNr 16S y del genoma completo de cepas de referencia, denominada TrueBac ID® (en la actualidad incluye más de 9.400 genomas completos), continuamente actualizada; y la *pipeline* o secuencia bioinformática optimizada que proporciona la identificación en base a la identidad de nucleótidos promedio (ANI) [Ha, 2019]. Disponible en <https://www.truebacid.com/genome>.

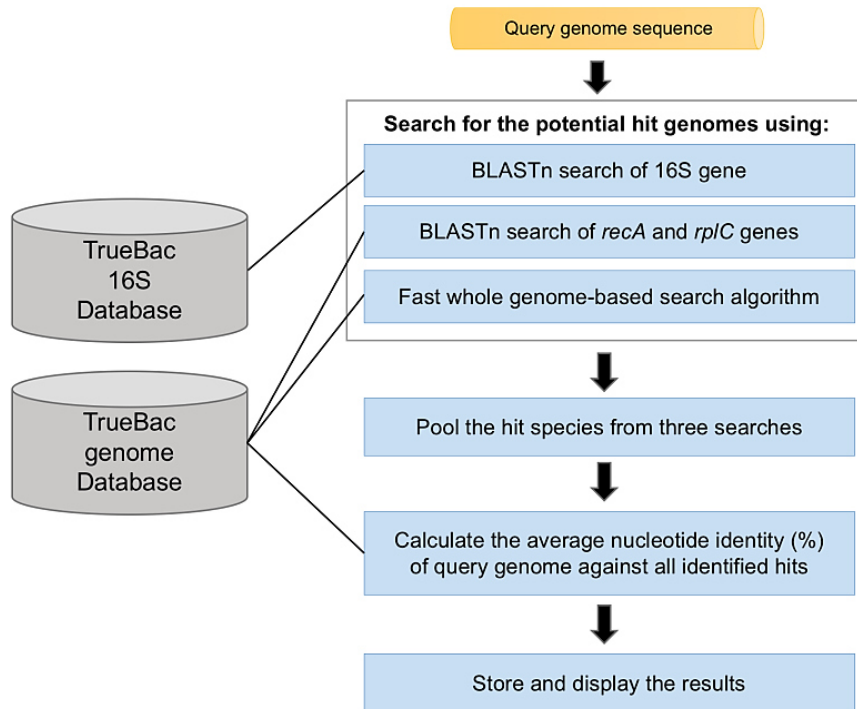


Figura 25 Flujo de identificación por el sistema TrueBac ID (Tomado de <https://help.ezbiocloud.net/user-guide/truebac-id/truebac-id-algorithm/>).

Idealmente, los valores de ANI para la secuencia del genoma problema se calculan enfrentándolo al genoma de las cepas tipo de todas las especies conocidas. Esto requeriría un enorme esfuerzo informático y no es eficiente, ya que solo estamos interesados en la identificación de especies. Por esta razón TrueBac ID adoptó un enfoque de dos pasos en el que, primero identifica el grupo de taxones más cercano desde el punto de vista filogenético mediante la búsqueda de tres genes, ARNr 16S, *recA* y *rplC* (estos dos últimos pertenecen al *core* del genoma) a partir de los datos del genoma completo y segundo, las especies potencial identificadas en el paso 1 se agrupan y se utilizan para calcular la identidad promedio de nucleótidos utilizando la herramienta MUMmer [Yoon, 2017]. La decisión para la identificación a nivel de especie se toma considerando ambos valores de similitud, ANIm y ARNr 16S.

Se ha evaluado el rendimiento de este sistema utilizando 36 aislamientos clínicos de distintas especies infrecuentes incluyendo *Nocardia* spp. que no fueron identificados por otros tres sistemas de MALDI-TOF MS, ni por ARNr 16S. TrueBac ID asignó el 94% de los aislados a especies conocidas, nuevas especies o genomoespecies, identificando el 6% restante a nivel de género [Ha, 2019].

-Microbial Genomes Atlas (MIGA): Este proyecto ofrece una clasificación taxonómica de un genoma problema o de varias secuencias *contig* ensambladas basándose en ANI o, para las secuencias más divergentes (de especies más lejanas), en la identidad promedio de aminoácidos (AAI). La base de datos de referencia utilizada para la comparación puede ser RefSeq de NCBI, que abarca 1.927 genomas completos de alta calidad pertenecientes a 1.865 especies (a partir de mayo de 2018 es actualizado bimensualmente), o de la base de datos del genoma NCBI, sección procariota, que incluye 11.487 genomas de 3.921 especies (de actualización mensual). MiGA identifica la cepa de referencia más parecida a la secuencia de consulta basándose en los valores ANI/AAI y posteriormente evalúa si la secuencia de consulta debe ser asignada al mismo rango taxonómico (especie, género, etc.) o, en su lugar, si representa un nuevo taxón en ese rango. Se proporciona información adicional incluyendo estadísticas de la secuencia, calidad del genoma y tipo de material (cuando está disponible) [Rodríguez-R, 2018]. Disponible en <http://microbial-genomes.org/>.

-Type Strain Genome Server (TYGS): Es una plataforma de acceso libre que pertenece al Leibniz Institute DMSZ. Realiza en cálculo de similitud entre el genoma problema y sus genomas de cepas-tipo más cercano a partir de la secuencia de ARNr 16S obtenida por secuenciación masiva. Para acelerar el procesamiento, todas las comparaciones entre genomas de cepas-tipo se han calculado antes de la consulta del usuario. Los datos resultantes se utilizan posteriormente para inferir la hibridación ADN-ADN estimada (dDDH) y árboles filogenéticos, utilizando el método *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) que incluye 100 *bootstraps* o combinaciones posibles de asociación en cada cálculo [Meier-Kolthoff, 2019]. Disponible en <https://tygs.dsmz.de/>.

-JSpecies: Se trata de una interfaz fácil de usar para calcular el índice ANI y la correlación de tetranucleótidos por pares. El paquete JSpecies implementa el índice de correlación de tetranucleótidos, un parámetro que generalmente se correlaciona con ANI y que puede servir para decidir cuándo un par de organismos dados deben clasificarse dentro de la misma especie [Ritcher, 2016]. Además, para fines

taxonómicos, los análisis se pueden producir simplemente secuenciando aleatoriamente al menos el 20% del genoma de las cepas problema en lugar de obtener su secuencia completa. Usa tanto BLAST como MUMmer para la comparación, empleando MUMmer cuando los genomas son filogenéticamente muy cercanos. Aunque es de acceso libre, desafortunadamente, el software MUMmer no está por el momento disponible para ningún sistema operativo de Microsoft, limitando el número de usuarios [Delcher, 2003]. Disponible en <http://www.imedeia.uib.es/jspecies/>.

7.4.2. DESCRIPCIÓN DE NUEVAS ESPECIES

El concepto de especie para los organismos procariotas no ha sido consensuado entre los diferentes científicos que abordan su significado [Balloux, 2018]. Cada descripción de nueva especie debe ir acompañada de un gran número de datos fenotípicos, quimotaxonómicos, genotípicos, y genómicos propios de esta cepa como el valor de G+C, las relaciones filogenéticas con las especies más próximas y la hibridación ADN-ADN, junto a otro tipo de datos como pruebas bioquímicas de asimilación de sustratos, temperaturas de crecimiento, composición de ácidos grasos, ubiquinonas respiratorias,... Dadas las limitaciones y complicaciones que supone la obtención de estos datos por métodos convencionales, las plataformas que infieren estos datos a partir del genoma completo suponen el método más valioso para la descripción de nuevas especies bacterianas. Por ejemplo, en las especies *Nocardia yunnanensis*, *Nocardia mangyaensis* y *Nocardia stercoris*, recientemente descrita, estos valores se han obtenido de los datos de WGS [Zhang, 2019; Yang, 2019; Zhao, 2020]. A medida que aumente el número de genomas bacterianos disponible y la información se haga accesible, el uso de secuencias completas del genoma en la caracterización de especies bacterianas proporcionará mayores oportunidades de realizar asignaciones taxonómicas correctas y de descripción de nuevas especies [Colston, 2014].

7.4.3 ESTUDIO DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS

WGS se puede utilizar para caracterizar un aislado clínico, informando sobre la especie y/o subtipo al que pertenece y permitiendo así el estudio filogenético de una secuencia dada en relación con un conjunto existente de aislamientos. Los estudios filogenéticos basados en WGS ofrecen una resolución muy superior en comparación con otros marcadores, como el esquema MLST. También es aconsejable su empleo cuando las técnicas estándar como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la

repetición en tándem de número variable (VNTR), y MALDI-TOF no pueden distinguir con precisión el linaje de la cepa estudiada [Balloux, 2018].

La secuenciación del genoma completo ha demostrado ser de gran utilidad para aclarar las posiciones taxonómicas en otros géneros, por ejemplo, para *Acinetobacter* usando ANI y filogenia del gen central [Chan, 2012], para *Vibrio* usando ANI y MLSA basado en información del genoma [Thompson, 2009] y para *Aeromonas*, donde se empleó ANI, *in silico* DDH y MLST [Colston, 2014].

Extrapolando la técnica de MLST a las técnicas de WGS encontramos los esquemas de cgMLST (*core genes* MLST), que consisten en un conjunto mayor de genes conservados de todo el genoma bacteriano. Los alelos sustituyen así a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o las secuencias concatenadas para mitigar los efectos de la recombinación y permitir una nomenclatura global y pública (<https://www.cgmlst.org/>). Con el programa bcgTREE se pueden inferir árboles filogenéticos a partir de estos genes seleccionados. Consta de un *pipeline* que extrae automáticamente 107 genes conservados del genoma completo que se encuentran en la mayoría de las bacterias. En caso de que no se haya encontrado alguno de estos genes dentro del proteoma específico, las alineaciones se complementan con espacios o *gaps* para este organismo. Los modelos son estimados individualmente para cada región, obteniendo como resultado un árbol filogenético de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) con altos valores de soporte de *bootstrap*. Varios parámetros internos (por ejemplo, el número de bootstraps) pueden ser modificados por el usuario [Ankenbrand, 2016].

También la plataforma chewBBACA (<https://github.com/B-UMMI/chewBBACA>) fue diseñada para ayudar a los usuarios en la concatenación y evaluación de genomas completos o genomas nuevos, en la tipificación gen por gen y en la posterior llamada a variantes. Permite la definición de esquemas wg / cgMLST (*whole-genome* y *core-genome* MLST) de genomas completos o borradores (*draft genome*), proporcionados por el usuario, excluyendo los genes parálogos, detectando la contaminación y las estructuras de baja calidad y consultando las decisiones de los usuarios hacia la identificación a través del análisis interactivo de datos gráficos. Utiliza el software Python 3.4 o superior y puede ser ejecutado en un PC portátil o en equipos de alto rendimiento, lo que lo hace accesible tanto para pequeños laboratorios como para grandes centros de referencia [Silva, 2018].

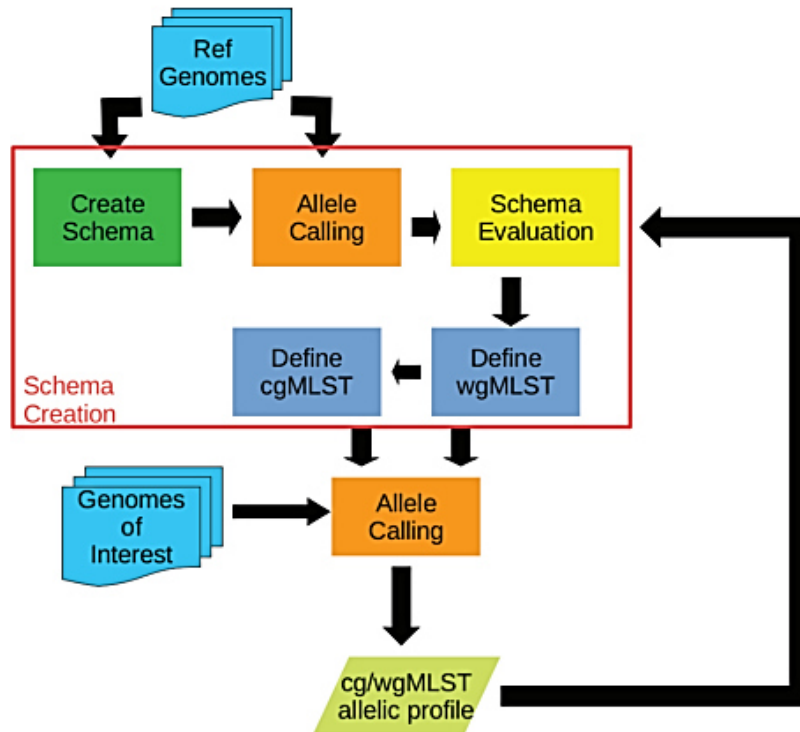


Figura 26 Flujo de trabajo de la plataforma chewBBACA. Tomado de <https://github.com/B-UMMI/chewBBACA>

7.4.4 IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS

Es una técnica en auge que permite comprobar la existencia de los genes de los que depende la virulencia, la resistencia a fármacos, la fabricación de compuestos bioactivos, ... Ya en 1998, Cole y colaboradores describieron un amplio número de genes encontrados en *Mycobacterium tuberculosis* gracias a la secuenciación masiva [Cole, 1998].

Los métodos de cultivo tradicionales requieren un tiempo de crecimiento prolongado, los cultivos bacterianos tardan en crecer de 1 a 5 días, los de hongos de 7 a 30 días y los cultivos de micobacterias de 14 a 60 días. En este escenario, el WGS se utiliza como tecnología complementaria principalmente para proporcionar información sobre la presencia de genes que condicionan la resistencia y virulencia, lo cual es particularmente útil para mecanismos que son difíciles de determinar fenotípicamente (por ejemplo, la resistencia a carbapenem) [Balloux, 2018].

WGS ofrece la posibilidad de predecir el perfil de resistencia total de un organismo procariota a múltiples antimicrobianos (resistoma). Posiblemente, el primer intento real de predecir el resistoma a partir de los datos de WGS fue un estudio de Holden *et al.* de 2013, que muestra que, para un gran conjunto de aislamientos de *Staphylococcus aureus* ST22, el 98,8% de todas las resistencias fenotípicas podrían explicarse por al menos un elemento o mutación en los genes que codifican la resistencia, previamente documentados en los datos de la secuencia genómica [Holder, 2013].

Aunque se han desarrollado bastantes estudios, no se encuentran evidencias suficientes para apoyar el uso de técnicas de secuenciación masiva para inferir los patrones de sensibilidad antibiótica y con esto guiar la toma de decisiones clínicas para la mayoría de las especies bacterianas [Ellington, 2017]. Aun así, se han desarrollado varias herramientas para la predicción de fenotipos de resistencia a partir de los datos de WGS. Estos incluyen aquellos diseñados para la predicción del fenotipo de resistencia de los genes adquiridos, como ResFinder [Zarkari, 2012] y ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>), los genes cromosómicos, como Arg-Annot [Gupta, 2014], y herramientas de búsqueda de secuencias para la resistencia a los antimicrobianos, como SSTAR [de Man, 2016], y CARD, la base de datos integral de resistencia a antibióticos [McArthur, 2013]. De estos, ResFinder y CARD son herramientas on-line, con lo que dependen del tráfico de datos, y pueden ser considerablemente más lentos que las demás herramientas de estructura más sencilla, aunque su utilización es mucho más asequible por el usuario poco experimentado [Balloux, 2018].

7.5. Aplicaciones más recientes en el género *Nocardia*

En 2018, Nouioi y colaboradores publicaron la reorganización de las familias de Actinobacterias basándose en el genoma completo de 1.142 actinobacterias en lugar de en la secuencia de ARNr 16S. Sugieren la existencia de 2 órdenes, 10 familias y 17 géneros, así como la transferencia de más de 100 especies a otros géneros. Estas incongruencias entre los datos obtenidos a partir de los genes ribosómicos ARNr 16S/23S y del genoma completo subrayan el error inherente cuando el estudio de la filogenia se basa en la secuenciación de un solo gen. Este mismo estudio también permitió completar la descripción del tamaño y el contenido en G+C de un gran número de especies, incluyendo 26 especies del género *Nocardia* [Nouioi, 2018].

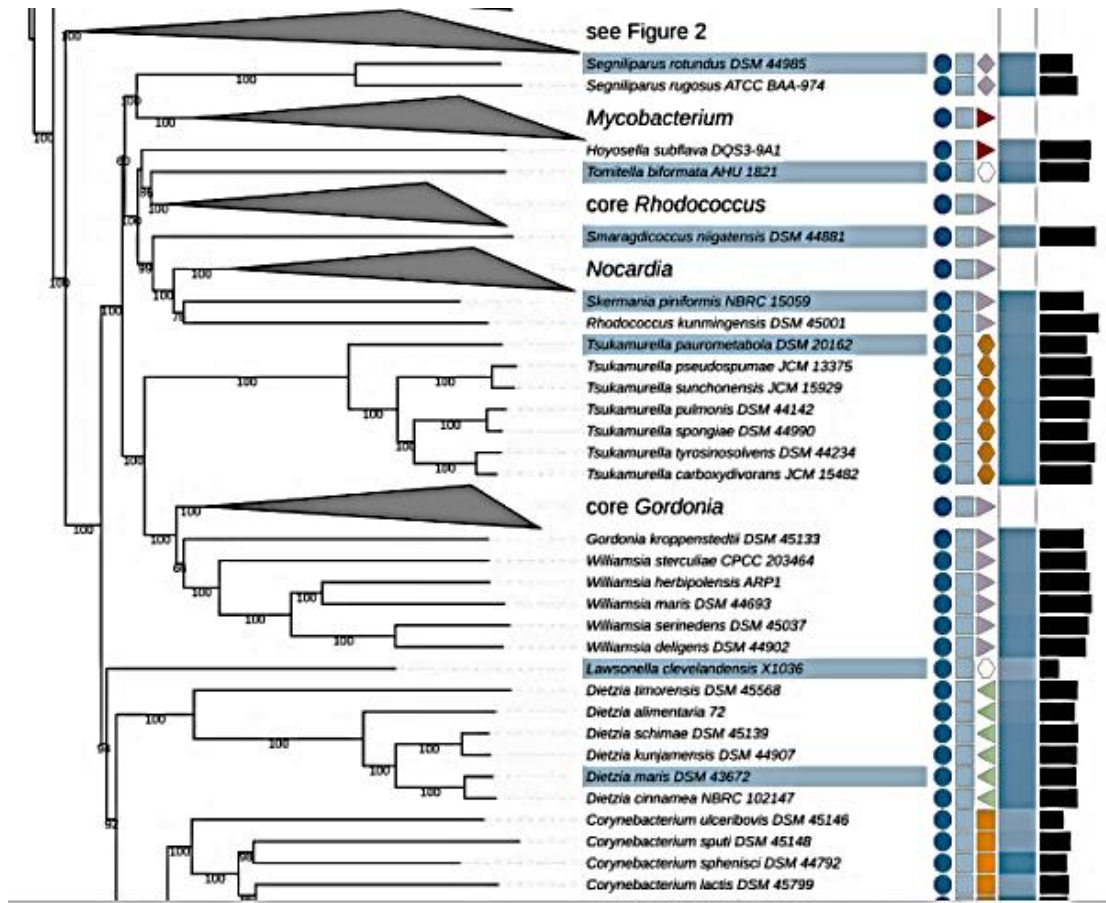


Figura 27 Sección del árbol filogenético basado en el genoma completo de actinobacterias que corresponde al género *Nocardia*. Tomado de Nouioi y colaboradores [Nouioi, 2018]

En ese mismo año, Tamura y colaboradores estudiaron el esquema MLSA de los genes *atpD-groL1-groL2-recA-rpoA-secY-sodA-ychF* (9.680 nucleótidos) extraídos del genoma completo de 72 cepas tipo de *Nocardia* y propusieron su reclasificación basándose en la secuencia del genoma y en sus pruebas fenotípicas. Entre las especies afectadas se encuentran *N. soli* y *N. cummidelens* que se proponen como un sinónimo heterotípico posterior (anteriormente conocido como sinónimo taxonómico) de *N. salmonicida*, *N. elegans* como sinónimo heterotípico posterior de *N. nova*, *N. gamkensis* como sinónimo heterotípico posterior de *N. exalbida*, y *N. coubleae* como sinónimo heterotípico posterior de *N. ignorata* [Tamura, 2018].

Ha y colaboradores también demostraron en 2019 la utilidad de estas técnicas para la asignación de especie a organismos poco comunes en la práctica clínica que no han sido identificados por técnicas de PCR o MALDI-TOF, mediante la plataforma TrueBac ID [Ha, 2019].

Durante el año 2019 se describieron 4 nuevas especies de *Nocardia* (*Nocardia zhihengii*, *Nocardia yunnanensis*, *Nocardia mangyaensis* y *Nocardia aurea*) mediante WGS, y 3 especies más (*Nocardia panacis* -en proceso de aceptación-, *Nocardia colli* y *Nocardia stercoris*) [Zhao, 2020; Zhou, 2020; Hu, 2020], a Julio de 2020. La primodescripción de los genomas completos disponibles de las principales especies causantes de casos nocardiosis se recopilan en el Anexo VIII.

7.6 Perspectivas futuras

Se está realizando un gran esfuerzo para añadir la secuenciación masiva al análisis microbiológico, tanto a nivel de diagnóstico como para el estudio de las relaciones patógeno-hospedador y la predicción de estructuras que condicionan su resistencia a antimicrobianos y su producción de antibióticos. El estudio del genoma completo de los organismos procariotas nos permite obtener datos de la epidemiología, virulencia, y adaptación, no sólo de individuos aislados, sino también de comunidades microbianas, permitiendo así profundizar en el conocimiento de la etiología de las enfermedades infecciosas.

Actualmente la actividad a realizar se divide principalmente en dos pasos, uno de ellos realizado desde el punto de vista microbiológico, como es la extracción y secuenciación del genoma, más técnico, y otro posterior desde el punto de vista bioinformático, para el análisis de los datos obtenidos previamente. Completar ambas tareas por el mismo personal no es siempre posible, pues los métodos bioinformáticos de análisis son complejos y requieren personal especializado y entrenado. A ello se suma la rápida progresión de estos.

No obstante, se desarrollan *pipeline* o rutas bioinformáticas más sencillas, sobre todo de acceso libre, asequibles para usuarios poco entrenados que engloban varios pasos del análisis, como los recursos que se indican en tabla 8.

Tabla 8 Resumen de los principales flujos de trabajo para el tratamiento de los datos obtenidos por secuenciación masiva. Tomado de Xavier y colaboradores [Xavier, 2020]

Plataforma	Dirección web	Características
IRIDA	https://www.irida.ca/workflows/	Proporciona un flujo de trabajo para ensamblaje (SPAdes), anotación (Prokka), filogenia basada en SNPs (SNVPhyl), resistencia (CARD) y virulencia (Islandviewer) pero no para plásmidos y tipificación por MLST
INNUENDO	https://github.com/theInnuendoProject/INNUENDO	Con su flujo de trabajo de INNUca proporciona un buen control de calidad de las lecturas, ensamblaje <i>de novo</i> y evaluación de calidad de los contigs
NULLARBOR	https://github.com/tseemann/nullarbor	Admite datos de secuenciación de extremo emparejado de Illumina pero no lecturas de extremo único, ni de Illumina ni de Ion Torrent.
BACPIPE	https://hub.docker.com/r/mahmed/bacpipe	Software de código abierto capaz de realizar una gran cantidad de análisis, control de calidad de datos, ensamblaje del genoma y anotación, lo que facilita la tipificación bacteriana, resistencia y virulencia y predicción de genes, así como la filogenia basada en SNPs

Por otro lado, la tendencia actual trata de unificar diferentes análisis en una única plataforma adaptada a usuarios con menor manejo de las herramientas bioinformáticas se está implantando. Un ejemplo, lo constituye la plataforma MicroScope. Fue lanzado en 2005, no es de acceso libre y se actualiza continuamente. Es un software integrado para la gestión de datos, anotación, análisis comparativo y visualización de genomas procariotas especialmente para la revisión de la calidad de la anotación funcional. Se le han añadido mejoras como su base EggNOG (predicción de ortología por pares), que es un recurso que proporciona grupos ortólogos (OG) de proteínas a diferentes niveles taxonómicos, cada uno con sus anotaciones funcionales. Añade también el concepto de pangenoma gracias a la herramienta PanRGP, que ofrece un resumen de los genes implicados en la resistencia a los antibióticos, virulencia, genes precursores de compuestos biosintéticos, sistemas macromoleculares e integrones, obteniendo así una lista detallada de los genes potencialmente adquiridos por transferencia horizontal (HGT) que se agrupan en regiones genómicas (Región de plasticidad genómica, RGP), y otra lista de estos genes similares en otras cepas cercanas [Vallenet, 2017].

A pesar de los esfuerzos en el campo de la bioinformática de aumentar la accesibilidad para usuarios con menor nivel de experiencia, el desarrollo o programación subyacente que conllevan estas aplicaciones hacen necesaria una mayor formación en esta área de la que se dispone actualmente por parte de las nuevas generaciones de microbiólogos. La tendencia actual es la automatización de la parte técnica y la

dedicación de los mayores recursos al estudio del patógeno en sí, integrando la información aportada por la microbiología convencional.

Aún hay que dedicar muchos esfuerzos a la estandarización y validación de estos métodos novedosos para la práctica clínica, con la ampliación y acceso público de las bases de datos y plataformas de análisis, la actualización de las técnicas y la cualificación del personal responsable.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



El género *Nocardia* comprende parte de las Actinobacterias más predominantes de la microbiota del suelo. Es un microorganismo que causa infección en humanos tras inhalación o inoculación traumática. Afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos, pero también a pacientes inmunocompetentes causando afectación en pulmón, tejidos blandos, huesos, articulaciones o sistema nervioso central (SNC), ocasionando su diseminación sistémica a través de rutas hematógenas. Aunque en los últimos años han aumentado las tasas de morbi/mortalidad por el incremento de las poblaciones de riesgo (inmunodeprimidos, receptores de transplantes, pacientes oncológicos, población inmunosenescente, etc.) y los avances de las técnicas diagnósticas, se sigue considerando una enfermedad infradiagnosticada.

Por otro lado, en las últimas décadas hemos asistido a cambios taxonómicos significativos en la clasificación de *Nocardia*, principalmente debido al establecimiento de la secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S) como técnica de referencia para la identificación de cepas del género *Nocardia* en sustitución de las técnicas fenotípicas. Más del 85% de todas las especies de *Nocardia* han sido identificadas mediante esta diana taxonómica, evolucionado la identificación hacia técnicas multigénicas (secuenciación de genes conservados o *housekeeping*), proteómicas (MALDI-TOF MS) y genómicas (secuenciación del genoma completo). Asimismo, estas mismas técnicas se pueden aplicar a la tipificación de aislados, lo cual nos permitirá conocer las relaciones evolutivas entre distintas poblaciones de *Nocardia* spp.

Los objetivos generales planteados en esta tesis incluyen la identificación taxonómica y tipificación de las distintas especies del género *Nocardia* circulantes en nuestro país para esclarecer las relaciones filogenéticas entre especies y dentro de la misma especie. Con este objetivo se llevó a cabo el análisis de genes conservados.

A partir de este contexto, los objetivos específicos de trabajo de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

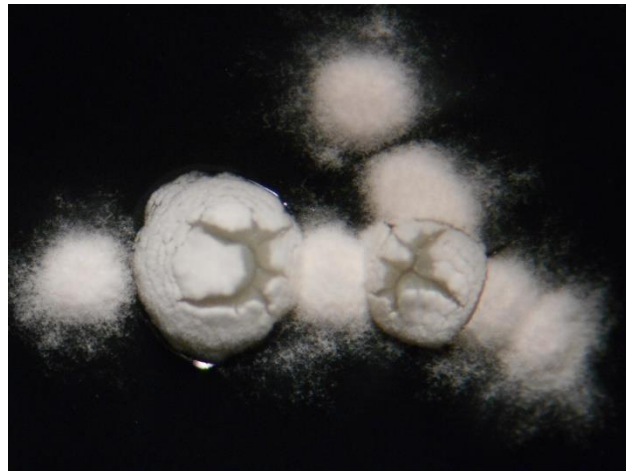
1. Identificar las especies de *Nocardia* spp. responsables de cuadros clínicos en humanos, que presentaron una mayor prevalencia en nuestro país durante un periodo de estudio de 5 años, mediante la secuenciación parcial y completa del gen ARNr 16S.
2. Evaluar la capacidad de los genes *gyrB* y *rpoB* como herramientas taxonómicas para identificar y tipificar las cepas clínicas de las especies de *Nocardia* más prevalentes en España respecto a la secuenciación parcial del gen ARNr 16S.
3. Estudiar la idoneidad del empleo del gen *gyrB* como técnica única o complementaria para la identificación y tipificación de las especies prevalentes de *Nocardia* y el análisis de la estructura poblacional de las mismas.
4. Explorar las ventajas y limitaciones del gen *gyrB* para identificar, tipificar y discriminar entre especies de *Nocardia* poco prevalentes, cercanas filogenéticamente y pertenecientes a complejos.
5. Aplicar las dianas taxonómicas (ARNr 16S, *gyrB* y *rpoB*) en la asignación de especie para las especies responsables de cuadros clínicos severos en cepas con identificación dudosa.
6. Analizar la capacidad de la técnica de espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) para su aplicación en la identificación de especies del género *Nocardia* spp. en el contexto epidemiológico de nuestro país con una distribución diferencial en las especies productoras de cuadros clínicos. Comparación de los resultados de la identificación con los obtenidos mediante las dianas genéticas.
7. Aplicar el esquema tetragénico de *multilocus sequence analysis* (MLSA), como elemento decisor para la asignación de especies del género *Nocardia* en el caso de resultados discrepantes. Asignación taxonómica de las cepas clínicas de *Nocardia* spp. y estudio de las relaciones filogenéticas existentes entre cepas de especies de distinta prevalencia.

8. Estudiar del genoma completo de cepas de *Nocardia* spp. pertenecientes a especies de reciente interés como patógeno humano para su identificación y caracterización mediante diferentes plataformas y programas informáticos.

9. Identificar y estudiar la filogenia de cepas de *Nocardia* spp. procedentes de suelo. Comparación de sus características respecto a cepas pertenecientes a la misma especie y con origen humano.

10. Estudiar los genomas completos de aquellas cepas procedentes de suelo que presenten características diferenciales con la aplicación de los índices de actual uso en taxonomo-genómica.

PUBLICACIONES





Statement of Author Rights

[ASM Author Center / Preparing Your Manuscript](#)

1 Authors may post their articles to their institutional repositories

ASM grants authors the right to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by funding agencies, as well as appropriate institutional or subject-based open repositories established by a government or non-commercial entity.

In preparation for the REF 2021, ASM would like to remind Authors that the [current author fee structure](#), along with the policy outlined above, allows authors to comply with the [HEFCE deposition requirements](#). If authors have paid a fee to make their article "gold" open access then there is no need to worry about these deposition requirements ([See section 38 of the "Policy for open access in Research Excellence Framework 2021" document](#)).

Please note that ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication.

2 Authors may post their articles in full on personal or employer websites

ASM grants the author the right to post his/her article (after publication by ASM) on the author's personal or university-hosted website, but not on any corporate, government, or similar website, without ASM's prior permission, provided that proper credit is given to the original ASM publication.

Once ASM grants permission to the author, ASM requests that the posting release date for the content be no earlier than 6 months after the final publication of the typeset article by ASM.

3 Authors may make copies of their articles in full

Corresponding authors are entitled to 10 free downloads of their papers. Additionally, all authors may make up to 99 copies of his/her own work for personal or professional use (including teaching packs that are distributed free of charge within your own institution). For orders of 100 or more copies, you should seek ASM's permission or purchase access through Highwire's Pay-Per-View option, available on the ASM online journal sites.

4 Authors may republish/adapt portions of their articles

ASM also grants the author the right to republish discrete portions of his/her article in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. An ASM author also retains the right to reuse the full article in his/her dissertation or thesis. "Proper credit" means either the copyright lines shown on the top of the first page of the PDF version, or "Copyright © American Society for Microbiology, [insert journal name, volume number, year, page numbers and DOI]" of the HTML version. For technical questions about using Rightslink, please contact Customer Support via phone at (877) 622-5543 (toll free) or (978) 777-9929, or e-mail Rightslink customer care at customercare@copyright.com.

Identification, Typing, and Phylogenetic Relationships of the Main Clinical *Nocardia* Species in Spain According to Their *gyrB* and *rpoB* Genes

Gema Carrasco, Sylvia Valdezate, Noelia Garrido, Pilar Villalón, María J. Medina-Pascual, Juan A. Sáez-Nieto

Laboratorio de Taxonomía, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

This study compares the identification, typing, and phylogenetic relationships of the most prevalent clinical *Nocardia* species in Spain, as determined via sequence analysis of their housekeeping genes *gyrB* and *rpoB*, with the results returned by the gold standard 16S rRNA method. *gyrB* and *rpoB* analyses identified *Nocardia abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, and the *N. nova* complex, species that together account for more than half of the human nocardiosis cases recorded in Spain. The individual discriminatory power of *gyrB* and *rpoB* with respect to intraspecies typing, calculated using the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI), was generally high (HGDI, 0.85 to 1), except for *rpoB* with respect to *N. farcinica* (HGDI, 0.71). Phylogenetically, different degrees of intra- and interspecies microheterogeneity were observed for *gyrB* and *rpoB* in a group of 119 clinical strains. A single 16S haplotype was obtained for each species, except for the *N. nova* complex (8 types), while *gyrB* and *rpoB* were more polymorphic: *N. abscessus* had 14 and 18 haplotypes, *N. cyriacigeorgica* had 17 and 12, *N. farcinica* had 11 and 5, and the *N. nova* complex had 26 and 29 haplotypes, respectively. A diversity gradient was therefore seen, with *N. farcinica* at the bottom followed by *N. abscessus* and *N. cyriacigeorgica* in the middle and *N. nova* complex at the top. The complexity of the *N. nova* complex is highlighted by its six variations in the GyrB¹²⁶AAPEH motif. *gyrB* sequencing (with or without *rpoB* sequencing) offers a simple means for identifying the most prevalent *Nocardia* species in Spanish medical laboratories and for determining the intraspecific diversity among their strains.

Members of the genus *Nocardia* are ramified Gram-positive bacilli that normally live in dust, sand, soil, decaying vegetation, and stagnant water (1). To date, nearly 99 *Nocardia* species have been identified (see NCBI taxonomy for *Nocardia*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1817> and <http://www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html>), but this number undergoes constant modification. Some one-third of *Nocardia* species are known human pathogens, and new pathogenic species causing different clinical problems are constantly being discovered (2, 3). Infection occurs mainly via the respiratory tract, later disseminating to other locations, such as the central nervous system. Localized infection is caused by traumatic injury and gives rise to abscesses (4).

Partial 16S rRNA gene sequencing is the gold standard for identifying *Nocardia* spp. (1). However, the conservation of 16S can be an obstacle to distinguishing between closely related species, such as those of the *Nocardia nova* complex (5, 6). To overcome this disadvantage and to establish phylogenetic relationships at the intra- and interspecies levels, other protein-encoding genes have been studied, such as the 65-kDa heat shock protein *hsp65* (7), the essential secretory protein *secA1* (8), *gyrB*, which is the β -subunit of DNA gyrase and a type II DNA topoisomerase (9), and *rpoB*, which is the β -subunit of DNA-dependent RNA polymerase (RNAP) (6).

gyrB promotes negative supercoiling in the bacterial chromosome during DNA replication, while *rpoB* is involved in transcription. These protein-encoding genes offer advantages over RNA-encoding genes as molecular markers; as housekeeping genes, they are less susceptible to horizontal gene transfer and can be analyzed at the nucleotide and amino acid levels to determine phylogenetic relationships (10).

The majority of phylogenetic studies on *Nocardia* spp. have involved just one strain that is representative of each species, tak-

ing into account the combinations of many genes (6, 11). No studies, however, have been performed that have examined large numbers of clinical strains per species.

The aims of the present work were to (i) compare a sequence analysis of *gyrB* and *rpoB* against partial 16 rRNA gene sequencing (the gold standard) for identifying, typing, and determining the phylogenetic relationships between clinical strains of *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, and the *N. nova* complex (collectively the most prevalent clinical *Nocardia* species in Spain), and (ii) to gain insight into the intraspecific diversity of these strains via the analysis of these housekeeping genes.

MATERIALS AND METHODS

***Nocardia* strains.** A total of 119 strains of *Nocardia* spp., belonging to the four species most commonly collected in Spain, *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, and the *N. nova* complex, were isolated from clinical samples submitted for identification to the Spanish National Center of Microbiology (Majadahonda, Madrid, Spain) between 2006 and 2010. Isolates were grown in heart infusion Columbia agar supplemented with 5% (vol/vol) sheep blood and buffered charcoal-yeast extract (BCYE) for 48 to 72 h at 37°C under aerobic conditions.

Received 25 February 2013 Returned for modification 3 April 2013

Accepted 15 August 2013

Published ahead of print 21 August 2013

Address correspondence to Sylvia Valdezate, svaldezate@isciii.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00515-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00515-13

TABLE 1 Characteristics of the four most prevalent species of *Nocardia* isolated from clinical samples in Spain between 2006 and 2010

<i>Nocardia</i> species (no. of strains)	Genes (bp) ^a	No. of haplotypes (HGDI, S ² , SD) ^b	No. of SNPs (divergence rate) ^c	SNPs per strain (avg, mode)
<i>N. abscessus</i> (29)	16S rRNA (409)	1	0	0
	<i>gyrB</i> (653)	14 (0.889, 0.002, 0.046)	24 (0.0–1.7)	0–9 (3, 2)
	<i>rpoB</i> (354)	18 (0.948, 0.00058, 0.024)	65 (0.0–16)	6–49 (42, 44)
<i>N. cyriacigeorgica</i> (30)	16S rRNA (514)	1	0	0
	<i>gyrB</i> (727)	17 (0.94, 0.00055, 0.023)	77 (0.0–5.6)	0–38 (28, 36/38)
	<i>rpoB</i> (354)	12 (0.88, 0.00135, 0.037)	24 (0.0–4.4)	4–15 (9, 13)
<i>N. farcinica</i> (31)	16S rRNA (507)	1	0	0
	<i>gyrB</i> (739)	11 (0.854, 0.0014, 0.038)	11 (0.0–0.8)	0–6 (3, 2/4)
	<i>rpoB</i> (351)	5 (0.716, 0.001, 0.036)	9 (0.0–1.4)	4–6 (4, 4)
<i>N. nova</i> (29)	16S rRNA (529)	8 (0.672, 0.00739, 0.086)	8 (0.0–1.1)	0–4 (1, 2)
	<i>gyrB</i> (698)	26 (0.985, 0.0003, 0.017)	51 (0.0–5.2)	0–36 (22, 34)
	<i>rpoB</i> (285)	29 (1.0, 0.00008, 0.009)	49 (0.7–12.6)	16–44 (32, 31)

^a Analyzed size in number of base pairs.

^b HGDI, Hunter-Gaston discriminatory index; S², variance.

^c SNP, single nucleotide polymorphism; the divergence rate is expressed as a percentage among strains of each group.

16S, *gyrB*, and *rpoB* sequencing. DNA was extracted by the boiling method. Amplification was performed using PuReTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom) under the following conditions: 30 cycles at 95°C for 1 min, primer annealing (5 pM) at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1.5 min. The primers used for 16S amplification and sequencing were 5'-GCTTAACACATGC AAGTCG-3' and 5'-GAATTCCAGTCTCCCCTG-3' (8), for *gyrB* they were 5'-GAGGTCGTCATGACCCAGCTGCA-3' and 5'-GTCTTGGTC TGGCCCTCGAACTG-3' (9), and for *rpoB* they were 5'-CGACCACTT CGGCAACCG-3' and 5'-TCGATCGGCACATCCGG-3' (12). The amplification products were electrophoresed and purified using ExoSAP-IT reagent (GE Healthcare, NJ, USA) and sequenced by capillary electrophoresis in an ABI Prism 3100 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

16S, *gyrB*, and *rpoB* analyses. Sequences were assembled using SeqMan software (DNASTar, Inc., Madison, WI). The sequence lengths were adjusted to match the length of the shortest sequence of each species and aligned using the ClustalW algorithm (see <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). The Hunter-Gaston discrimination index (HGDI) (13), single nucleotide polymorphisms (SNPs), haplotype numbers, and other variables (Table 1) were assessed using DnaSP software (14). A phylogenetic assessment of each species was undertaken using MEGA 4.1 software (15). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining (16), maximum-parsimony (17), and maximum-likelihood methods (18), with bootstrap analyses based on 1,000 resamplings. Branches corresponding to partitions that were reproduced in <50% of bootstrap replicates were collapsed. The evolutionary distances between the nucleotide and amino acid sequences of the *rpoB* and *gyrB* genes were determined using the Kimura 2-parameter model and the Poisson correction model (19). *N. farcinica* strain DSM 43665^T (GenBank accession no. NC_006361) was used as an outgroup (see <http://nocardia.nih.gov/jp/>), except in *N. farcinica* analyses, in which *N. abscessus* strain DSM 44432^T (GenBank accession no. JN041489 for 16S, AB447398 for *gyrB*, and JN215593 for *rpoB*) was employed.

Species assignment and assignment of detected polymorphisms. The 16S, *gyrB*, and *rpoB* fragments sequenced for each *Nocardia* strain were compared to sequences in the GenBank database and identified using BLAST (version 2.2.10; see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and the Bioinformatics Bacteria Identification (BIBI) version 0.2 software (see <http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>). A similarity score of ≥99.0% between the 16S rRNA sequence and database sequence(s) was deemed to indicate that strains belonged to the same spe-

cies (20). Species assignment was confirmed via the greatest similarity with respect to the 16S, *gyrB*, and *rpoB* sequences. To detect polymorphisms and their genome positions, the following type strains were used: *N. abscessus* DSM 44432^T (GenBank accession no. JN041489 for 16S, AB447398 for *gyrB*, and JN215593 for *rpoB*), *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T (GenBank accession no. GQ376180 for 16S, GQ496121 for *gyrB*, and JN215664 for *rpoB*), *N. farcinica* DSM 43665^T (GenBank accession no. GQ217499 for 16S, GQ496115 for *gyrB*, and DQ085117 for *rpoB*), and *N. nova* DSM 44481^T (GenBank accession no. GQ376190 for 16S, GQ496102 for *gyrB*, and JN215754 for *rpoB*).

RESULTS

Between 2006 and 2010, 698 clinical strains of *Nocardia* spp. were submitted to our center for identification by 16S analysis. The most prevalent *Nocardia* spp. responsible for severe clinical conditions were *N. abscessus*/*N. asiatica* (15.9%), *N. cyriacigeorgica* (24.5%), *N. farcinica* (13.6%), and the *N. nova* complex (13.0%). For each species, some 30 strains of different geographical origins and clinical backgrounds were selected (see Table S1 in the supplemental material).

Table 1 shows the corresponding HGDI and SNP variables (number, arithmetic mean and mode, etc.) for the 16S, *gyrB*, and *rpoB* genes for each species.

Analysis of 16S polymorphisms. Twenty-nine *N. abscessus* strains shared a 16S rRNA haplotype that was also identical to that of *N. abscessus* strain DSM 44432^T (GenBank accession no. JN041489) and *N. asiatica* DSM 44668^T (GenBank accession no. DQ659897). This full similarity between *N. abscessus* and *N. asiatica* is a consequence of the fact that the current 16S fragment used in routine clinical testing does not include the area of difference (which extends from the middle of the gene to the 3'-end).

Thirty *N. cyriacigeorgica* strains had a common 16S haplotype, which was also that of *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T (GenBank accession no. GQ376180). All 31 *N. farcinica* strains had the same 16S haplotype, which was identical to that of *N. farcinica* DSM 43665^T (GenBank accession no. GQ217499). Eight 16S haplotypes were found in 29 *N. nova* complex strains with respect to the reference strain *N. nova* DSM 44481^T (GenBank accession no. GQ376190) (similarity, ≥99%).

TABLE 2 GyrB amino acid polymorphisms identified in the *N. abscessus* (*n* = 29), *N. cyriaciageorgica* (*n* = 30), and *N. nova* (*n* = 29) strains

Species	Amino acid (nucleotides) at the indicated positions (1–4) ^a								
<i>N. farcinica</i> DSM 43665 ^b	160	161	164	181	183	185	187	188	233
<i>N. abscessus</i> strains ^c									
DSM 44432 ^b (<i>n</i> = 11)	10 Glu (GAG)							38 Lys (AAG)	
Mutated ^b (<i>n</i> = 18)	Lys (AAG)							Gln (CAG)	
Frequency (%)	3.4							3.4	
<i>N. cyriaciageorgica</i> strains ^d									
DSM 44484 ^c (<i>n</i> = 8)	29 Val (GTC)	32 Ala (GCC)	49 Ile (ATC)				53 Pro (CCG)	55 Thr (ACG)	
Mutated ^d (<i>n</i> = 22)	Ile (ATC)	Asp (GAC)	Val (GTT)				Ala (GCG)	Ser (TCC), Lys (AAG)	
Frequency (%)	3.3	3.3	3.3				43.3	36.7 6.6	
<i>N. nova</i> strains ^e									
DSM 44481 ^d (<i>n</i> = 8)					51 Gly (GGT)		101 Glu (GAG)		
Mutated ^d (<i>n</i> = 21)					Asp (GAC), Ser (AGC)		Gln (CAG)		
Frequency (%)					3.4, 3.4		62.0		

(Continued on next page)

Analysis of *gyrB* polymorphisms. Table 2 shows the identified GyrB amino acid substitutions, their types, and frequencies, along with the HGDI values and the percent divergence between the studied strains. Figure S1 in the supplemental material shows the inferred phylogenetic tree for the 4 studied species. The topologies of the trees produced by the neighbor-joining, maximum-parsimony, and maximum-likelihood methods were almost identical (data not shown).

(i) ***N. abscessus* strains.** To confirm the above identifications that were made using the partial 16S sequence, several reference strains were used in *gyrB* analysis: *N. abscessus* DSM 44432^T (GenBank accession no. AB447398) and *N. asiatica* DSM 44668^T (GenBank accession no. GQ217495). All 29 studied strains showed a *gyrB* sequence that was similar (98.3 to 99.8%) to that of the reference strain *N. abscessus* DSM 44332^T. None showed the sequence seen in *N. asiatica* DSM 44668^T (similarity, 94.9 to 95.8%), which lacks three nucleotides possessed by *N. abscessus* DSM 44432^T (¹⁰⁹Ala [GCC]-¹¹⁰Ala [GCG] is modified to ¹⁰⁹Ala [GCG]). The 14 *gyrB* haplotypes found fell into one SNP cluster group (SCG) along with *N. abscessus* DSM 44332^T, and the *gyrB* haplotype of *N. asiatica* DSM 44668^T lay outside this cluster (Table 1; see also Fig. S1 in the supplemental material). A total of 24 SNPs were detected.

The GyrB protein of all 29 strains harbored ¹⁰⁹Ala-¹¹⁰Ala. Eighteen strains showed four amino acid substitutions with respect to the GyrB protein of *N. abscessus* DSM 44432^T (accession no. BAH10710). The most common change was the appearance of ⁸⁷Glu (seen as the only substitution in 13 strains but appearing in 58.6% of the strains in some combination with other changes). ¹⁰Lys, ³⁸Gln, and ¹⁰⁹Ser appeared in one, one, and three strains, respectively.

(ii) ***N. cyriaciageorgica* strains.** Seventeen *gyrB* haplotypes were identified for *N. cyriaciageorgica* DSM 44484^T (GenBank accession no. GQ496121) (similarity values, 95.6 to 99.9%), which fell into two SCGs. Seventy-seven SNPs were detected (Table 1; see also Fig. S1 in the supplemental material).

In comparison with the *N. cyriaciageorgica* DSM 44484^T (GenBank accession no. ACV89678) GyrB reference sequence, 22 strains (73.3%) showed a total of 14 amino acid replacements in 12 locations, resulting in 9 GyrB protein types (Table 2). The amino acid changes accumulated in individual strains ranged from 1 to 7.

(iii) ***N. farcinica* strains.** Eleven *gyrB* haplotypes were identified for *N. farcinica* DSM 43665^T (GenBank accession no. GQ217499) (similarity, 99.2 to 99.9%) (Table 1), all of which fell into one SCG. Eleven SNPs were detected, all of which were silent.

(iv) ***N. nova* complex strains.** In *gyrB* analysis, several reference sequences were taken into account due to the closeness of the *N. nova* complex members (21): *N. nova* DSM 44481^T (GenBank accession no. GQ496102), *N. aobensis* DSM 44805^T (GenBank accession no. JN041378), *N. cerradoensis* DSM 44546^T (GenBank accession no. GQ496123), *N. kruczakiae* DSM 44877^T (GenBank accession no. AB450793), *N. elegans* DSM 44890^T (GenBank accession no. AB450785), and *N. africana* DSM 44491^T (GenBank accession no. JN041368). Twenty-six *gyrB* haplotypes were found with respect to *N. nova* DSM 44481^T (GenBank accession no. GQ496102) (83.1 to 99.9%), which fell into 2 SCGs. Fifty-one *gyrB* SNPs were detected. Almost 59% of the strains harbored ≥ 22 SNPs, with a maximum of 36 SNPs in a strain.

The GyrB protein of 21 strains showed a ¹²⁹Pro insertion compared to the reference strain *N. nova* DSM 44481^T (GenBank accession no. ACV89659) and 10 of the other studied strains. This difference thus divided them into two separate clades. Eleven GyrB protein types were seen. Eight amino acid changes were detected with respect to the sequence of the *N. nova* DSM 44481^T protein (Table 2). The substitutions accumulated per strain ranged from 0 to 7 (mode, 6). The combination ¹⁰¹Gln-¹⁰⁵Glu-¹²⁹Pro-¹³¹Pro/Arg-¹⁵⁷Ala was seen in 17 strains with the ¹²⁹Pro insertion, and ¹²⁹Pro-¹³¹Pro/Arg-¹⁵⁷Ala was seen in two strains. The triple amino acid association ¹²⁹Pro-¹³¹Pro-¹⁵⁷Ala was found in the *N. aobensis*, *N. cerradoensis*, and *N. kruczakiae* reference strains. In addition, the ¹²⁶AAAPEH motif was seen in three GyrB protein types (possessed in 10 strains). However, in the strains with the ¹²⁹Pro insertion (underlined below), this motif was changed to AAAPPEP in 1 GyrB protein type (two strains), to SAAPPEP in 2 GyrB protein types (3 strains) (SAAPPEP was also seen in the *N. aobensis* DSM 44805^T and *N. kruczakiae* DSM 44877^T reference strains), to TAAPPEP in 3 GyrB protein types (12 strains) (similar to the motif TATPPEP seen in the *N. cerradoensis* DSM 44546^T reference strain), to TAAPPER in one GyrB protein type (one strain), and finally to NAAPPEP in 1 GyrB protein type (one strain) (see Fig. S3 in the supplemental material). Strains with the ¹²⁹Pro insertion and GyrB changes showed a range of similarity scores of 16S with respect to the *N. nova* DSM 44481^T of 99.2% to

TABLE 2 (Continued)

Amino acid (nucleotides) at the indicated positions (1–4) ^a										
237	238	240	257	258	259	260	262	265	292	349
87 Asp (GAC) Glu (GAA) 58.6										
						109 Ala (GCC) Ser (TCC) 10.3				
	106 Thr (ACC) Ala (GCC)	108 Val (GTC) Ile (ATC)	125 Ala (GCC) Glu (GAG)	126 Glu (GAG) Gln (CAG)		127 Ala (GCG) Thr (ACG)	128 Gln (CAG) Pro (CCG), Ala (GCG)	130 Thr (ACC) Ala (GCC)		
	6.6	20.0	23.3	23.3		23.3	66.6 3.3	50.0		
105 Asp (GAT) Glu (GAG)				126 Ala (GCG) Thr (ACC), Ser (AGC), Asn (AAC)				129 ^c Pro (CCG)	131 Hys (CAG) Pro (CCG), Arg (CGG)	157 Pro (CCG) Ala (GCC)
62.0				44.8, 10.34, 3.4				65.5	62, 3.4	215 Val (GTG) Phe (TTC)
									68.9	3.4

^a Amino acid polymorphism positions (modified nucleotides are underlined) with respect to the complete genome sequence of reference strain *N. farcinica* DSM 43665^T (accession no. NC_006361), *N. abscessus* DSM 44432^T (accession no. AB447398), *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T (accession no. GQ496121), and *N. nova* DSM 44481^T (accession no. GQ496102).

^b All the *N. farcinica* strains harbored the same GyrB as *N. farcinica* DSM 43665^T (accession no. NC_006361).

^c No. of GyrB types, 5; HGDI, 0.94; divergence, 0.5 to 1.4%.

^d No. of GyrB types, 9; HGDI, 0.94; divergence, 0.4 to 4.3%.

^e No. of GyrB types, 11; HGDI, 0.81; divergence, 0.4 to 2.6%.

100%. These percentage scores decreased (~1 to 2 percentage points) when the comparison was done with respect to the *N. aobensis*, *N. cerradoensis*, and *N. kruczakiae* reference strains.

Analysis of rpoB polymorphisms. Figure S2 in the supplemental material shows the phylogenetic trees produced according to the neighbor-joining method that were based on the *rpoB* gene.

(i) ***N. abscessus* strains.** Eighteen haplotypes were found for the 29 studied strains with respect to the *rpoB* gene of the reference strain *N. abscessus* DSM 44432^T (GenBank accession no. JN215593) (similarity range, 84.0 to 99.7%). Sixty-five SNPs were detected. Thirty-three nucleotides were changed in >85% of the strains; these SNPs divided the 29 strains into two clades, with 26 strains in the larger clade. Nineteen of these changes resulted in 15 RpoB protein types (Table 3).

(ii) ***N. cyriacigeorgica* strains.** Twelve *rpoB* haplotypes were identified for *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T (GenBank accession no. DQ085116) (95.6 to 99.7% similarity). Twenty-four SNPs were identified (Table 1; see also Fig. S2 in the supplemental material). All these SNPs were synonymous, i.e., they did not affect the amino acid sequence of the RpoB protein.

(iii) ***N. farcinica* strains.** Five *rpoB* haplotypes were detected with respect to the reference strain *N. farcinica* DSM 43665^T (GenBank accession no. DQ085117) (96.5 to 99.7% similarity). Nine SNPs were seen. A common RpoB protein type was seen for the entire population.

(iv) ***N. nova* complex strains.** Each strain showed a different *rpoB* haplotype compared to the reference strain *N. nova* DSM 44481^T (GenBank accession no. JN215754) (87.4 to 99.3% similarity). Forty-nine SNPs were detected. Twenty amino acid changes in 14 locations led to 22 RpoB protein types (Table 3).

Nucleotide sequence accession numbers. The new variants of 16S, *gyrB*, and *rpoB* sequences of each studied species were assigned the GenBank accession no. KC662119 to KC662126 and KC631324 to KC631385.

DISCUSSION

In Spain, the estimated incidence of nocardial infection in the population as a whole is 0.55/100,000 (22), although solid organ

recipients, people with chronic lung disease, diabetes mellitus, or an immunodeficiency, and those undergoing corticosteroid treatment are more susceptible. Over the last 10 years, the main etiological agents of human nocardiosis in the country have been *N. abscessus* (prevalence, 13.8%), *N. cyriacigeorgica* (25.5%), *N. farcinica* (12.5%), and *N. nova* complex (14.5%) (figures were obtained from 1,024 *Nocardia* isolates from across the country). When these rates are compared with those reported in studies that examined >90 isolates, differences in the prevalences of the four species can be seen; e.g., in Guipuzcoa (northern Spain), the prevalences of the four species are 12.4, 15.0, 23.1, and 29.6 (23), in Belgium, 6.5, 14.0, 44.1, and 21.5 (24), in Taiwan, 2.0, 16.0, 8.0, and 5.3 (25), and in the United States, 5.6, 13.2, 14.0, and 28.0, respectively (26).

The classification of species and subgroups of the genus *Nocardia* has traditionally been based on the evaluation of growth characteristics, antibiotic resistance, and biochemical testing (1). However, these methods are laborious and time-consuming (6 to 8 weeks). Molecular methods provide crucial insights into identification, epidemiology, and intraspecies variability. 16S analysis is the gold standard and allows for rapid identification, but the conservation of the studied sequence means that it cannot be used to study intrageneric relationships. Therefore, other targets need to be explored (11). Typing techniques, such as pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism, have been shown to be unsatisfactory for distinguishing between *N. farcinica* strains involved in outbreaks (27).

Housekeeping genes, such as *secA1*, *hsp65*, *rpoB*, and *gyrB* (2, 7–9), may be better molecular markers than 16S for such analyses. When *secA1* was examined, several disagreements with 16S-based identifications were seen for very closely related species (e.g., *N. abscessus* and *N. asiatica*) (8). *hsp65* shows better discriminatory power at the species level but not as much as *gyrB* and *rpoB* (6, 9). Even in species with nearly identical 16S sequences, *rpoB* and *gyrB* polymorphisms are highly discriminatory (6) and show close correlations with the identification results of DNA-DNA hybridization tests (11). *gyrB* has even been shown to be useful in the description of new *Nocardia* species (2, 3).

TABLE 3 RpoB amino acid polymorphisms identified in the *N. abscessus* ($n = 29$) and *N. nova* ($n = 29$) strains

Species	RpoB amino acid (nucleotides) at the indicated positions (1–6) ^a										
<i>N. farcinica</i> DSM 43665	357	358	361	365	367	376	378	405	413	414	420
<i>N. abscessus</i> strains ^b											
DSM 44432 ($n = 11$) ^c	3 Leu (CTC)	3 Asp (GAC)	3 Gly (GGC)			13 Ile (ATC)		42 Ile (ATC)	50 Ala (GCG)		
Mutated ($n = 18$)	Ile (ATC)	Ala (GCC)	Arg (CGC)			Met (ATG)		Met (ATG)	Gly (GGG)		
Frequency (%)	3.4	3.4	3.4			10.3		89.6	86.2		
<i>N. nova</i> strains ^d											
DSM 44481 ($n = 0$)				2 Leu (CTG)	4 Thr (ACG)	13 Leu (CTG)	15 Val (GTC)			51 Ile (ATC)	57 Thr (ACC)
Mutated ($n = 29$)				Val (GTC), Gly (GGC)	Pro (CCC)	Ile (ATC), Met (ATG)	Ile (ATC)			Val (GTC)	Ser (ACT)
Frequency (%)				93.1, 6.9	10.3	93.1, 6.9	100			96.5	34.5

(Continued on next page)

In two recent multilocus sequence typing studies involving reference strains for each species examined, five and 14 housekeeping genes were tested as markers of diversity in *Nocardia* (6, 11). However, if smaller numbers of housekeeping genes could be used in identification procedures, these analyses could be simpler and cheaper. Certainly, the analyses of *gyrB* and *rpoB* appear to identify the strains of the four main *Nocardia* species, type them at the inter- and intraspecies levels, and provide information on nocardial community diversity, a relevant event in clinical settings (28).

Because of the sequenced size and the criterion of 99% sequence similarity, the results of 16S analysis were not conclusive for *N. abscessus* and the *N. nova* complex strains. The study of the whole-gene 16S may distinguish *N. abscessus* from *N. asiatica* and allow for a more accurate species assignment of the *N. nova* complex. *Nocardia* species were previously clustered based on *gyrB* sequence similarity values of $\geq 93.5\%$ (9). Here, the lower scores for the similarities of each studied species were as follows: *N. abscessus*, 98.3%; *N. cyriacigeorgica*, 94.4%; *N. farcinica*, 99.2%; and *N. nova* complex, 94.8% (higher values than the one previously proposed). In the case of *rpoB*, the recommended limit for a wide number of bacterial genera was $\geq 94.0\%$ (29). *N. cyriacigeorgica* and *N. farcinica* strains showed higher minimum similarity scores, 95.6% and 98.6%, respectively. Meanwhile, *N. abscessus* and the *N. nova* complex displayed values lower than the suggested one (84.0% and 87.4%). The resulting scores are with respect to the considered type reference strains. Taking into account these criteria for the three genes, 65 strains simultaneously fulfilled them: 3 *N. abscessus* strains, 30 *N. cyriacigeorgica* strains, 31 *N. farcinica* strains, and 1 *N. nova* strain. Meanwhile, 54 strains fulfilled the 16S and *gyrB* breakpoints: 26 *N. abscessus* strains and 28 *N. nova* complex strains. Because of this dual behavior, *gyrB* and *rpoB* are complements of 16S identification, each with their usefulness and limits.

GyrB analysis was, however, very helpful in this respect. The GyrB of the strains from *N. abscessus* possessed ¹⁰⁹Ala-¹¹⁰Ala, as did the *N. abscessus* reference strains, while the reference strains of *N. asiatica* possessed ¹⁰⁹Ala. 16S analysis was sufficient to identify the *N. nova* complex. The *gyrB* gene of the *N. nova* complex strains, however, showed great variability, as revealed by the different motifs seen in the corresponding GyrB proteins. Similar heterogeneity was previously reported in the concatenated *gyrB*-

16S-*secA1-hsp65-rpoB* phylogenetic tree constructed in multilocus sequence analysis studies of species grouped in the *N. nova* complex (6).

Unfortunately, 16S analysis is unable to distinguish between the species within certain genera. *gyrB* and *rpoB* have also been used as identification tools, but the genetic similarity values at which identities are confirmed vary depending on the species and the target gene (30, 31). To make identifications based on *gyrB* or *rpoB*, it is necessary to analyze the sequences from large populations of the same species (30). Owing to the faster evolution of these genes, the ranges of similarity are wider than those reported for 16S (31) (in the present case, 83.4 to 99.2 for *gyrB* and 84.0 to 98.6 for *rpoB*). To date, no consensus divergence breakpoint has been fully established for the majority of bacterial species.

Typing was successful using just one of the housekeeping genes. For *gyrB* and *rpoB*, the HGDI values ranged from 0.88 to 1 in all species, except for *N. farcinica* (HGDI, 0.85 and 0.72 for *gyrB* and *rpoB*, respectively). One gene of these two was usually better, depending on the species. The abilities of *gyrB* and *rpoB* to discriminate between strains of the most prevalent species are important in confirming person-to-person transmission and for identifying new and recurrent infections. Thus, *gyrB* and *rpoB* are promising genes for use in molecular typing studies. The large number of *gyrB* and *rpoB* SNPs detected, both synonymous and nonsynonymous, provided insight into the diversity of these clinical strains (with the exception of *N. farcinica*).

After describing the genetic diversities of *gyrB* and *rpoB* in populations made up of different *Nocardia* species (7, 10, 12), the second step was to assess the intraspecies variation in a large number of strains. To our knowledge, this is the first work to explore this in a single-species scenario. Three levels of intraspecies diversity were seen: low level, which was shown by the *N. farcinica* strains with their 11 *gyrB* and 4 *rpoB* haplotypes, and single GyrB and RpoB protein types; mid-level, which was shown by the *N. abscessus* and *N. cyriacigeorgica* strains, whose large numbers of SNPs resulted in 14 *gyrB* and 18 *rpoB* and 17 *gyrB* and 12 *rpoB* haplotypes, respectively, along with 5 GyrB and 15 RpoB protein types among the *N. abscessus* strains and 9 GyrB and 1 RpoB protein types among the *N. cyriacigeorgica* strains; and high level, which was shown by the *N. nova* complex strains with their 26 *gyrB* and 29 *rpoB* haplotypes and 11

TABLE 3 (Continued)

RpoB amino acid (nucleotides) at the indicated positions (1–6) ^a												
423	425	427	429	430	434	435	438	451	456	464	465	471
60 Leu (CTG)	62 Gln (CAG)	64 Met (ATG)	66 Gln (CAG)	67 Asn (AAC)	71 Ser (TCG)	72 Gly (GGC)	75 Hys (CAC)	88 Ser (TCC)		101 Pro (CCG)	102 Ser (TCG)	108 Cys (TGC)
Met (ATG)	Val (GTG), Glu (GAG)	Leu (CTG)	Glu (GAG)	Arg (CGC)	Ala (GCC)	Ser (AGC)	Gln (CAG)	Thr (ACC)		Tyr (TAC)	Thr (ACC)	Ala (GCC)
96.5	86.2, 3.4	86.2	89.6	89.6	89.6	89.6	86.2	89.6		89.6	10.3	6.8
		64 Met (ATG) Leu (CTG)	66 Gln (CAG) Glu (GAA)	67 Asn (AAC) Arg (CGC), Ser (AGC), Hys (CAC), Cys (TGC)	71 Ser (TCG) Ala (GCC)	72 Gly (GGT) Ser (AGT)	75 Hys (CAC) Asn (AAC)	88 Ser (TCC) Cys (TGC), Thr (ACC)	93 Gly (GGC) Ala (GCT)			
		41.4	24.1	24.1, 20.7, 3.4, 3.4	80.7	89.6	27.6	10.4, 3.4	6.8			

^a Amino acid polymorphism positions (modified nucleotides are underlined) with respect to the complete genome sequence of reference strain *N. farcinica* DSM 43665^T (accession no. NC_006361), *N. abscessus* DSM 44432^T (accession no. JN215593), and *N. nova* DMS 44481^T (accession no. JN215754). All the *N. cyriaciageorgica* strains harbored the same RpoB as *N. cyriaciageorgica* DSM 44484^T (accession no. JN215664).

^b No. of RpoB types, 15; HGDI, 0.93; divergence, 0.9 to 12.6%.

^c A fragment of RpoB was not indicated in the GenBank-deposited *N. abscessus* DSM 44432^T (accession no. JN215593) data; here, a consensus sequence is described.

^d No. of RpoB types, 22; HGDI, 0.97; divergence, 1.1 to 11.1%.

GyrB and 22 RpoB protein types. The absence of the ¹²⁹Pro insertion differentiates *N. nova sensu stricto* from other members of the *N. nova* complex.

N. farcinica, with its few and always monomorphic SNPs, might belong to a younger lineage than the other species. In the *N. nova* strains identified as such by 16S analysis, variations in the GyrB motif ¹²⁶AAAPEH suggest different sublineages of recent appearance.

In conclusion, the present work shows that analysis of the *gyrB* or *rpoB* genes offers a rapid and relatively cheap means of studying strains of clinically important *Nocardia* species, in combination with 16S analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a grant to N.G. from the Instituto de Salud Carlos III (MPY-1446/11).

We are grateful to the CNM Biopolymers Unit for assistance in sequencing, to Adrian Burton for linguistic assistance in the preparation of the manuscript, and to the laboratories that submitted the *Nocardia* strains to our center for identification.

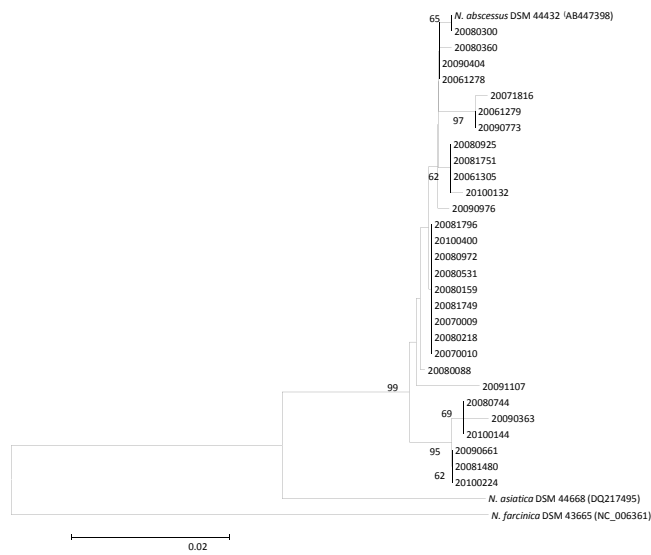
REFERENCES

- Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 19:259–282.
- Jannat-Khah D, Kroppenstedt RM, Klenk HP, Spröer C, Schumann P, Lasker BA, Steigerwalt AG, Hinrikson HP, Brown JM. 2010. *Nocardia mikamii* sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:2272–2276.
- Moser BD, Klenk HP, Schumann P, Pötter G, Lasker BA, Steigerwalt AG, Hinrikson HP, Brown JM. 2011. *Nocardia niwae* sp. nov., isolated from human pulmonary sources. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:438–442.
- Saubolle MA, Sussland D. 2003. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. J. Clin. Microbiol. 41:4497–4501.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. Clin. Microbiol. Infect. 14:908–934.
- McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. 2010. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 48:4525–4533.
- Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois JP, Boiron P, Laurent F. 2006. Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. J. Clin. Microbiol. 44:536–546.
- Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao M, Sorrell TC, Chen X, Chen SC. 2010. *secA1* gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. J. Clin. Microbiol. 48:3928–3934.
- Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gonoï T, Mikami Y. 2010. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. J. Med. Microbiol. 59:165–171.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Ford-Doolittle W, Kjelleberg S. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 73:278–288.
- Tamura T, Matsuzawa T, Oji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Katsumata H, Yamazoe A, Hamada M, Suzuki K, Gonoï T, Fujita N. 2012. A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. Antonie Van Leeuwenhoek 102:481–491.
- Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP. 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:293–302.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26:2465–2466.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451–1452.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596–1599.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406–425.
- Fitch WM. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst. Zool. 20:406–416.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17:368–376.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111–120.
- Kong F, Chen SCA, Chen X, Sintchenko V, Halliday C, Cai L, Tong Z, Lee OC, Sorrell TC. 2009. Assignment of reference 5'-end 16S rDNA sequences and species-specific sequence polymorphisms improves species identification of *Nocardia*. Open Microbiol. J. 3:97–105.
- Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Anderson VL, Fishbain JT, Holland SM, Witebsky FG. 2004. *Nocardia kruszczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "*N. nova* complex." J. Clin. Microbiol. 42:5139–5145.

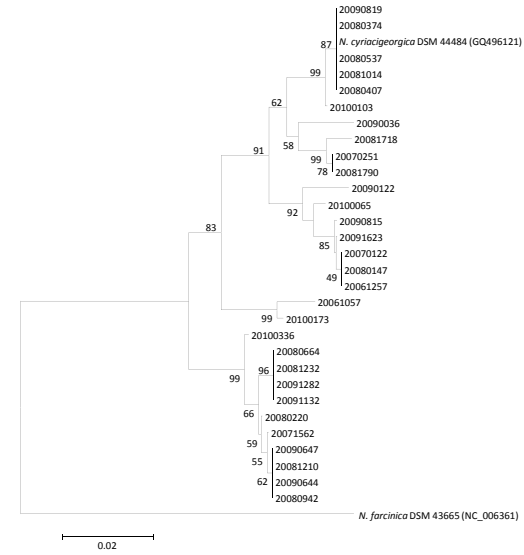
22. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P. 2009. Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine (Baltimore)* **88**: 250–261.
23. Larruskain J, Idigoras P, Marimón JM, Pérez-Trallero E. 2011. Susceptibility of 186 *Nocardia* sp. isolates to 20 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:2995–2998.
24. Glupczynski Y, Berhin C, Janssens M, Wauters G. 2006. Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by Etest. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:905–912.
25. Lai CC, Liu WL, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YT, Hsueh PR. 2011. Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, Taiwan, 1998–2009. *Clin. Infect. Dis.* **52**:833–835.
26. Uhde KB, Pathak S, McCullum I, Jr, Jannat-Khah DP, Shadomy SV, Dykewicz CA, Clark TA, Smith TL, Brown JM. 2010. Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, United States, 1995–2004. *Clin. Infect. Dis.* **51**:1445–1448.
27. Kalpoe JS, Templeton KE, Horrevorts AM, Endtz HP, Kuijper EJ, Bernards AT, Klaassen CH. 2007. Molecular typing of a suspected cluster of *Nocardia farcinica* infections by use of randomly amplified polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis, and amplified fragment length polymorphism analyses. *J. Clin. Microbiol.* **45**:4048–4050.
28. Muñoz J, Mirelis B, Aragón LM, Gutiérrez N, Sánchez F, Español M, Esparcia O, Gurguí M, Domingo P, Coll P. 2007. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997–2003. *J. Med. Microbiol.* **56**:545–550.
29. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. 2008. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologist. *Trends Microbiol.* **17**:37–45.
30. Tayeb LA, Lefevre M, Passet V, Diancourt L, Brisse S, Grimont PA. 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Res. Microbiol.* **159**:169–177.
31. Küpfer M, Kuhnert P, Korczak BM, Peduzzi R, Demarta A. 2006. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2743–2751.

TABLE S1. Strain distribution for each of the studied species of *Nocardia*.

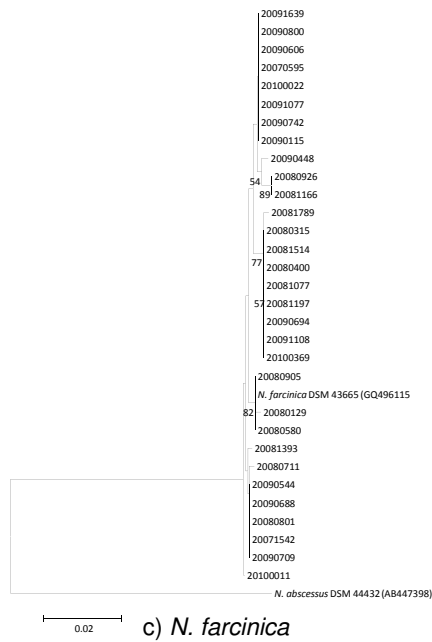
Species (Strain no.)	Spanish provinces (no.)	Clinical origins of the samples
<i>N. abscessus</i> (n=29)	18	24 respiratory system (13 sputum, 3 bronchial alveolar lavage, 6 bronchial alveolar aspirate, 1 nasal aspirate, 1 tracheal aspirate) 2 central nervous system, 2 blood, 1 cutaneous
<i>N. cyriacigeorgica</i> (n=30)	16	24 respiratory system (10 bronchial alveolar aspirates, 8 sputum samples, 4 bronchial alveolar lavages, 1 tracheal aspirate, and 1 pleural fluid sample), 2 central nervous system, 2 genital, 2 blood
<i>N. farcinica</i> (n=31)	18	22 respiratory system (13 sputum, 7 pulmonary abscess, 1 bronchial alveolar lavage, and 1 bronchial alveolar aspirate) 4 skin, 3 central nervous system and 2 blood
<i>N. nova</i> (n=29)	10	26 respiratory system (19 sputum, 4 bronchial alveolar aspirates, 2 pleural fluid and 1 tracheal aspirate) 1 skin and 2 internal tissues



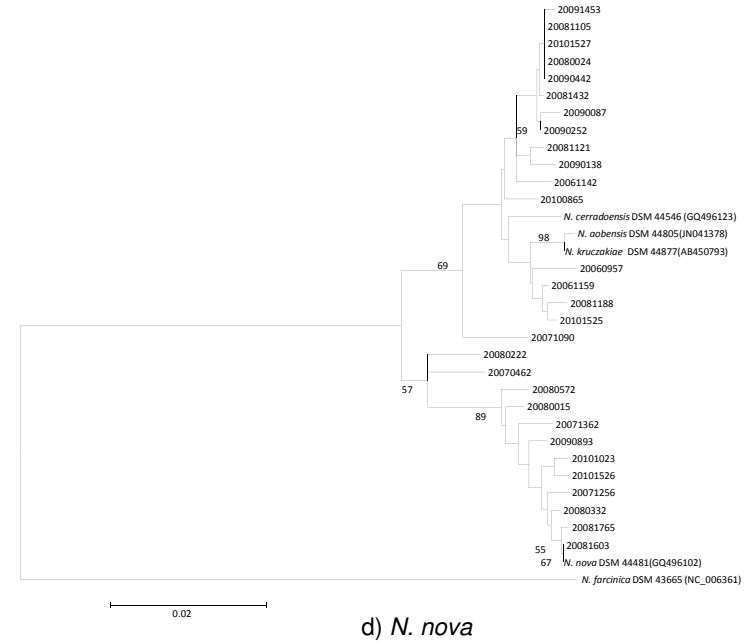
a) *N. abscessus*



b) *N. cyriacigeorgica*



c) *N. farcinica*



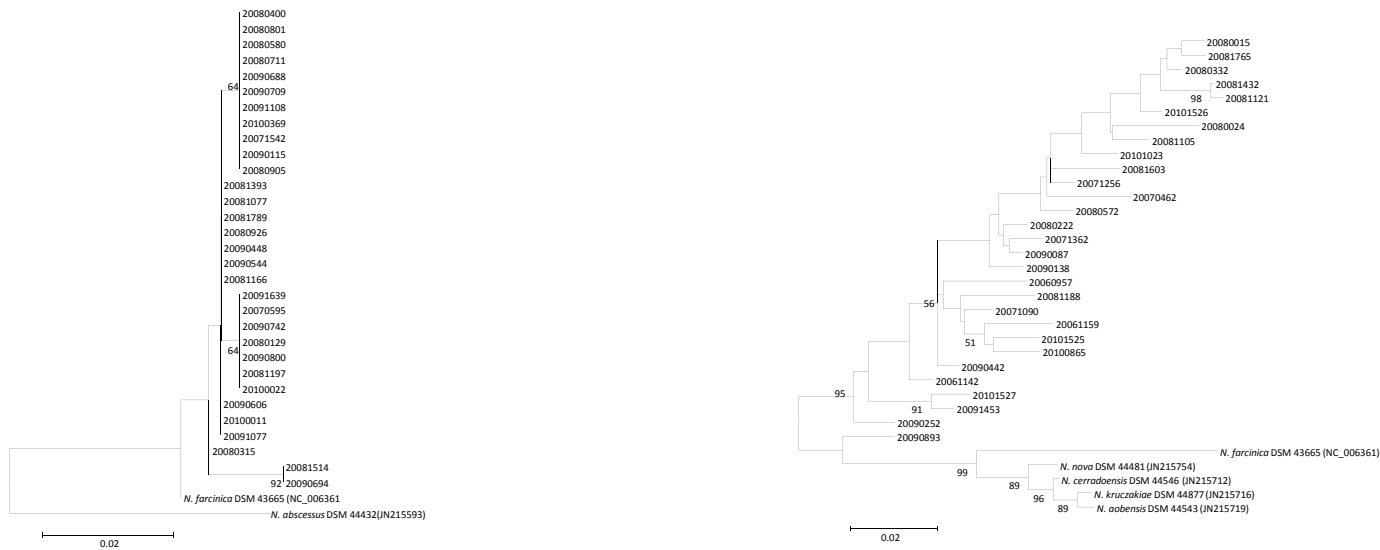
d) *N. nova*

FIG. S1. Phylogenetic trees according to neighbor-joining methods based on *gyrB* gene of *Nocardia* spp. four more prevalent species in Spain. Bootstrap values are expressed as a percentage of 1,000 replications. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position. *N. farcinica* DSM 43665 is used as outgroup, except in case of *N. farcinica* analysis when it is substituted by *N. abscessus* DSM 43665.



a) *N. abscessus*

b) *N. cyriacigeorgica*



c) *N. farcinica*

d) *N. nova*

FIG. S2. Phylogenetic trees according to neighbor-joining methods based on *rpoB* gene of *Nocardia* spp. four more prevalent species in Spain. Bootstrap values are expressed as a percentage of 1,000 replications. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position. *N. farcinica* DSM 43665 is used as outgroup, except in case of *N. farcinica* analysis when it is substituted by *N. abscessus* DSM 44432.

FIG. S3. Polymorphisms in the different GyrB-types found in the *N. nova* population (n=29).

Strain ID ^{1,2}	Position ³									Similarity Identity (%) ^{4,5}	GenBank acc. no.
	4 8	1 0 1	1 0 5	1 2 5	1 2 8	1 2 9'	1 3 1	1 5 7	2 1 5		
<i>N. nova</i> DSM 44481 ^T	G	E	D	A	A	–	E	P	V	100	GQ496102
CNM20101526	–	.	.	.	100 (100)	KC631363
CNM20071362	.	.	E	.	.	–	.	.	.	100 (99.6)	KC631362
CNM20080015	–	.	A	.	99 (100)	KC631361
CNM20080222	P	P	A	.	98 (99.8)	KC631360
<i>N. cerradoensis</i> DSM44546 ^T	.	.	E	T	T	P	P	A	.	96 (98.1)	AB450777
<i>N. aobensis</i> DSM 44805 ^T	.	Q	E	S	.	P	P	A	.	96 (97.9)	AB447401
<i>N. kruczakiae</i> DSM 44877 ^T	.	Q	E	S	.	P	P	A	.	96 (98.1)	AB450793
CNM20061159	.	Q	E	S	.	P	P	A	.	97 (99.2)	KC631359
CNM20060957	D	Q	E	S	.	P	P	A	.	97 (99.2)	KC631358
CNM20081188	.	Q	E	N	.	P	P	A	.	97 (99.2)	KC631357
CNM20090138	.	Q	E	T	.	P	R	A	.	97 (100)	KC631356
CNM20061142	S	Q	E	T	.	P	P	A	.	97 (100)	KC631355
CNM20081105	.	Q	E	T	.	P	P	A	.	97 (99.8)	KC631354
CNM20071090	.	Q	E	T	.	P	P	A	F	97 (99.6)	KC631353

¹Identification of the reference/studied strains; ²Strains representatives of the different GyrB-types mentioned in Figure S1; ³Positions of the amino acid change respect to *N. nova* DSM 44481^T; ^{4,5}Similarity identity coefficient, expressed as percentage, respect to *N. nova* DSM 44481^T GyrB protein sequence (CV89659) and 16S (GQ376190).

ARTÍCULO 1

Identificación, tipificación y relación filogenética de las principales especies clínicas de *Nocardia* spp. según sus genes *gyrB* y *rpoB*

“Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes”

Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Villalón P, Medina-Pascual MJ, Sáez-Nieto JA. Journal of Clinical Microbiology, 51(11), 3602–3608. <https://doi.org/10.1128/JCM.00515-13>

Epub 2013 Aug 21.

PMID: 23966490.

Factor de Impacto 2013: 4.232

Cuartil: Q1

Número de citas: 15



Statement of Author Rights

[ASM Author Center / Preparing Your Manuscript](#)

1 Authors may post their articles to their institutional repositories

ASM grants authors the right to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by funding agencies, as well as appropriate institutional or subject-based open repositories established by a government or non-commercial entity.

In preparation for the REF 2021, ASM would like to remind Authors that the [current author fee structure](#), along with the policy outlined above, allows authors to comply with the [HEFCE deposition requirements](#). If authors have paid a fee to make their article "gold" open access then there is no need to worry about these deposition requirements ([See section 38 of the "Policy for open access in Research Excellence Framework 2021" document](#)).

Please note that ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication.

2 Authors may post their articles in full on personal or employer websites

ASM grants the author the right to post his/her article (after publication by ASM) on the author's personal or university-hosted website, but not on any corporate, government, or similar website, without ASM's prior permission, provided that proper credit is given to the original ASM publication.

Once ASM grants permission to the author, ASM requests that the posting release date for the content be no earlier than 6 months after the final publication of the typeset article by ASM.

3 Authors may make copies of their articles in full

Corresponding authors are entitled to 10 free downloads of their papers. Additionally, all authors may make up to 99 copies of his/her own work for personal or professional use (including teaching packs that are distributed free of charge within your own institution). For orders of 100 or more copies, you should seek ASM's permission or purchase access through Highwire's Pay-Per-View option, available on the ASM online journal sites.

4 Authors may republish/adapt portions of their articles

ASM also grants the author the right to republish discrete portions of his/her article in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. An ASM author also retains the right to reuse the full article in his/her dissertation or thesis. "Proper credit" means either the copyright lines shown on the top of the first page of the PDF version, or "Copyright © American Society for Microbiology, [insert journal name, volume number, year, page numbers and DOI]" of the HTML version. For technical questions about using Rightslink, please contact Customer Support via phone at (877) 622-5543 (toll free) or (978) 777-9929, or e-mail Rightslink customer care at customercare@copyright.com.

gyrB Analysis as a Tool for Identifying *Nocardia* Species and Exploring Their Phylogeny

Gema Carrasco, Sylvia Valdezate, Noelia Garrido, María J. Medina-Pascual, Pilar Villalón, Juan A. Sáez-Nieto

Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

***gyrB* is used to improve the identification of the *Nocardia* species *N. brasiliensis*, *N. higoensis*, *N. ignorata*, *N. otitidiscaviarum*, *N. paucivorans*, *N. pneumoniae*, *N. puris*, *N. takedensis*, *N. veterana*, and *N. vinacea*, but it does not improve the identification of another 12 *Nocardia* studied species. *gyrB* provides typing and phylogenetic markers for *N. carnea*, *N. transvalensis*, *N. brasiliensis*, and *N. otitidiscaviarum*.**

Nocardia species are soilborne aerobic Gram-positive bacilli that can cause severe cutaneous, pulmonary, and central nervous system infections (1). 16S rRNA analysis has been the gold standard in the identification of these species, but their low mutation rates make closely related species difficult to distinguish.

gyrB has been used on its own in phylogenetic studies of *Nocardia* (2, 3) and in multilocus sequence typing pattern strategies (4) and has allowed new species to be described (5, 6). The phylogenetic relationships between very similar species can be difficult to establish when using 16S rRNA-based trees (7). However, knowledge of *gyrB* sequences may help in this respect. Certainly, *gyrB* shows remarkable variation across *Nocardia* species and has been used in the identification, typing, and phylogenetic examination of populations of the more common *Nocardia* species in Spain (i.e., those involved in 67% of clinical cases: *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, and *N. nova*) (3).

Here, we report an extension of the latter study (3), taking into account a collection of 75 strains belonging to 22 species and clustered into two groups: a commonly reported group (responsible for 13.0% of clinical cases of nocardiosis: *N. brasiliensis* [$n = 10$ strains], *N. carnea* [$n = 10$], *N. otitidiscaviarum* [$n = 10$], and *N. transvalensis* [$n = 10$]) and an unusually reported group, including 35 strains belonging to 18 species (responsible for <4.0% of clinical cases) (Table 1). The identifying and typing capacities of *gyrB*, a 16S target, and a 606-bp 16S fragment were compared.

Isolates were grown, their DNA was extracted, sequencing was performed, and phylogenetic trees were constructed as previously described (3). Isolates that were $\geq 99.0\%$ (for the 606-bp 16S fragment and full 16S gene sequence [8]) and $\geq 93.5\%$ (for *gyrB* [2]) similar to those with sequences in the GenBank database were deemed to be of the same species.

Partial and full 16S sequence analyses matched most of the time, but 5.5% and 8.5% of the strains from commonly reported groups and unusually reported species, respectively, showed discrepancies between 606-bp 16S fragment and full 16S gene sequence analyses because discrimination grows when the length increases. In any case, full 16S gene sequences were selected for classification.

Within the commonly reported group, the identification of all *N. brasiliensis* and *N. otitidiscaviarum* strains by all three methods was fully concordant. However, discrepancies were seen in the identification of 70% of the *N. carnea* strains and all *N. transvalensis* strains. Their relationships, based on the 16S and *gyrB* re-

sults, are shown in their corresponding phylogenetic trees (Fig. 1 and Table 2).

Three levels of diversity were seen for the *gyrB* gene and GyrB protein in the commonly reported group: a high level for *N. carnea* (211 single nucleotide polymorphisms [SNPs], 61 amino acid changes) and *N. transvalensis* (150 SNPs, 55 amino acid changes), a middle level for *N. brasiliensis* (51 SNPs, 19 amino acid changes), and a low level for *N. otitidiscaviarum* (7 SNPs, 1 amino acid changes).

The *N. carnea* strains showed the largest numbers of SNPs in *gyrB* and a similarity range of 80.9% to 100% compared to that of *N. carnea* W8368^T *gyrB* (GenBank accession no. GQ984361), followed by 79.2% to 94.0% compared to that of *N. flavorosea* CDC<USA-GA>:W9741^T *gyrB* (GQ496113). Three GyrB protein motives were found; five strains produced a protein with positions ¹²¹Hys(CAC) to ¹²²Asp(GAC) as seen in the GyrB protein of *N. carnea* ATCC 6847^T (ACX70140), four with a ¹²²Asp deletion, and one with the ¹²¹Leu(CTC) to ¹²²Asn(AAC) motif. These findings established three clonal lineages within the present *N. carnea* population (Fig. 1). Only three strains were confirmed by their *gyrB* genes as belonging to *N. carnea*. The remaining strains were identified as *N. flavorosea* ($n = 2$, both with the ¹²²Asp deletion), *N. rhamnosiphila* ($n = 1$), *N. blacklockiae* and *N. wallacei* ($n = 1$), and *N. testacea*, *N. jinanensis*, and *N. sienata* ($n = 3$). In previous taxonomic studies, *N. carnea* and *N. flavorosea* were clustered together by *gyrB* (2, 4).

The *gyrB* sequences of the *N. transvalensis* strains returned low similarity scores (below the cutoff value) with respect to *N. transvalensis* CDC<USA-GA>:W7518^T (GenBank accession no.

Received 27 October 2014 Returned for modification 14 November 2014

Accepted 22 December 2014

Accepted manuscript posted online 24 December 2014

Citation Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Sáez-Nieto JA. 2015. *gyrB* analysis as a tool for identifying *Nocardia* species and exploring their phylogeny. J Clin Microbiol 53:997–1001. doi:10.1128/JCM.03072-14.

Editor: G. A. Land

Address correspondence to Sylvia Valdezate, svaldezate@isciii.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03072-14>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.03072-14

TABLE 1 Characteristics of the 75 selected strains belonging to 22 *Nocardia* species^a

<i>Nocardia</i> sp. (no. of strains; no. of provinces)	Clinical origin(s)	Strain agreement between 16S and <i>gyrB</i> (no. of strains/total no. of strains)
Commonly reported group (40 isolates)		
<i>N. brasiliensis</i> (10; 8)	4 sputum, 2 cutaneous abscess, 4 wound	10/10
<i>N. carnea</i> (10; 5)	7 sputum, 1 gastric juice, 1 BAL fluid, ^b 1 perianal exudate	3/10
<i>N. otitidiscaviarum</i> (10; 8)	7 sputum, 2 pleural liquid, 1 BAL fluid	10/10
<i>N. transvalensis</i> (10; 8)	6 sputum, 1 cornea, 1 wound, 1 BAL fluid, 1 cutaneous abscess	0/10
Unusually reported species (35 isolates)		
<i>N. arthritis</i> (1; 1)	1 BAL fluid	1/1
<i>N. asteroides</i> (2; 2)	2 sputum	1/2
<i>N. beijingensis</i> (4; 3)	3 sputum, 1 BAL fluid	2/4
<i>N. elegans</i> (1; 1)	1 sputum	0/1
<i>N. exalbida</i> (1; 1)	1 pulmonary puncture	0/1
<i>N. flavorosea</i> (1; 1)	1 sputum	0/1
<i>N. higoensis</i> (1; 1)	1 sputum	0/1
<i>N. ignorata</i> (4; 2)	2 sputum, 1 wound, 1 gastric juice	4/4
<i>N. jiangxiensis</i> (1; 1)	1 sputum	0/1
<i>N. paucivorans</i> (2; 2)	1 sputum, 1 BAS ^c	2/2
<i>N. pneumoniae</i> (1; 1)	1 BAS	1/1
<i>N. puris</i> (2; 2)	2 sputum	2/2
<i>N. rhamnosiphila</i> cluster (4; 3)	3 sputum, 1 BAS	1/4
<i>N. takedensis</i> (3; 2)	3 sputum	3/3
<i>N. testacea</i> (3; 1)	3 sputum	2/3
<i>N. veterana</i> (1; 1)	1 sputum	1/1
<i>N. vinacea</i> (1; 1)	1 nodule	1/1
<i>N. wallacei</i> (2; 2)	2 sputum	0/2

^a *Nocardia* species were classified according to their full 16S sequences.

^b BAL, bronchoalveolar lavage.

^c BAS, bronchoaspirate.

GQ496089) (85.3% to 86.1%), while greater similarity was seen with *N. blacklockiae* CDC<USA-GA>:W8088^T (GQ496126) (89% to 95.5%) and *N. wallacei* CDC<USA-GA>:W7672^T (GQ496086) (88.6% to 98.4%). None of the present strains seemed to belong to *N. transvalensis sensu stricto* (9), as was reflected by the considerable number of SNPs accumulated per strain (103 to 112, with 68 common SNPs present in every strain).

For *N. brasiliensis*, the main cause of tissue infections (10), clustering by sample origin (6 cutaneous versus 4 respiratory strains) was observed in the 16S and *gyrB* trees (Fig. 1). The *N. brasiliensis* strains showed 7 out of the 19 amino acid changes to lie between positions 123 and 136 with respect to *N. brasiliensis* CDC<USA-GA>:W7503^T (GenBank accession no. GQ496125). In every other species, amino acid changes were distributed along the length of GyrB.

The *N. otitidiscaviarum* strains were the most homogeneous in terms of their 606-bp 16S fragment, 16S, and *gyrB* and GyrB sequences, with smaller haplotype numbers for the two genes.

In the unusually reported species, agreement between the 16S and *gyrB* results was observed for 21 strains (60.0%) of the species *N. higoensis*, *N. ignorata*, *N. paucivorans*, *N. pneumoniae*, *N. puris*, *N. takedensis*, *N. veterana*, and *N. vinacea* and one-half the *N. asteroides* strains, two-fourths of the *N. beijingensis* strains, one-fourth of the *N. rhamnosiphila* cluster, and one-third of the *N. testacea* strains (see Table S1 in the supplemental material). No agreement was seen for 14 strains (40.0%), i.e., the strains of *N. arthritis*, *N. elegans*, *N. exalbida*, *N. flavorosea*, *N. jiangxiensis*, and *N. wallacei*.

SNP numbers were analyzed as markers of variation in the

unusually reported species. The greatest diversity was seen for the *N. asteroides* 16S sequence (37 SNPs) and the *N. wallacei gyrB* and GyrB sequence (144 SNPs, 45 amino acid changes compared to those of the reference sequences) (see Table S1 in the supplemental material).

When the phylogenetic trees based on 16S and *gyrB* were compared, the strains classified as *N. paucivorans*, *N. veterana*, and *N. ignorata* remained together in both representations. However, strains belonging to *N. beijingensis* or *N. wallacei* grouped together in the 16S-based tree by species and separately in the *gyrB*-based tree. To a lesser extent, this happens in strains proceeding from *N. elegans*, *N. flavorosea*, *N. higoensis*, *N. rhamnosiphila*, and *N. testacea*. This shows the greater discriminating capacity of *gyrB* (Fig. 2). Changes in GyrB showed that >70% of the SNPs were silent, above all in the strains of *N. arthritis* and *N. veterana*. Nonsynonym substitution gathered predominantly between positions 778 and 787 with respect to the *N. farcinica* IFM10152 *gyrB* gene partial sequence (GenBank accession no. NC_006361), which corresponds to positions 260 to 264 of the *N. farcinica* IFM10152 GyrB protein sequence (YP_116212).

In the studied *Nocardia* strains, *gyrB* analysis improves identification based on full 16S gene sequences of infrequently isolated *Nocardia* spp. by confirming the classifications of strains which need further investigation for identification in 57.5% and 60% of the commonly reported group and unusually reported species, respectively.

To summarize, in the studied *Nocardia* strains, the combination of 16S and *gyrB* analysis improves the identification of commonly reported species, such as *N. brasiliensis* and *N. otitidiscav-*

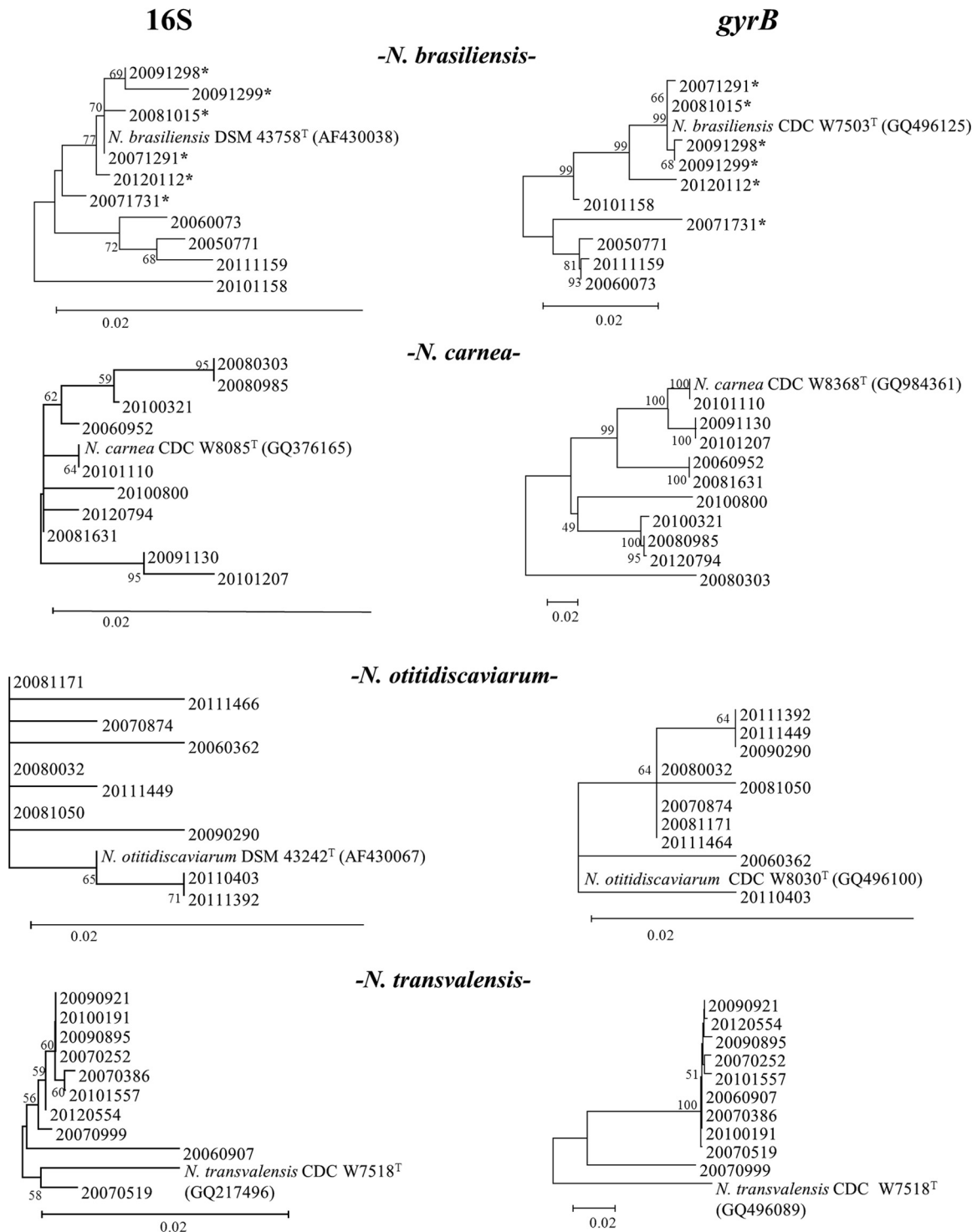


FIG 1 16S- and *gyrB*-based phylogenetic trees for *N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. transvalensis*, and *N. otitidiscaviarum* (neighbor-joining method). Each bootstrap value is expressed as a percentage of 1,000 replications. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position; *, strain from a cutaneous sample.

iarum, and unusually reported strains, such as *N. higoensis*, *N. ignorata*, *N. paucivorans*, *N. pneumoniae*, *N. puris*, *N. takedensis*, *N. veterana*, and *N. vinacea*, but it does not improve the identification of *N. carnea* or *N. transvalensis* of the commonly reported group or *N. arthritis*, *N. asteroides*, *N. beijingensis*, *N. elegans*, *N.*

exalbida, *N. flavorosea*, *N. jiangxiensis*, *N. rhamnosiphila*, *N. testacea*, or *N. wallacei* of the unusually reported species.

As the number of *gyrB* sequences in databases increases, *gyrB* sequencing should play an increasingly important role in the discrimination and typing of *Nocardia* spp.

TABLE 2 Diversities of the *N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. transvalensis*, and *N. otitidiscaviarum* strains as determined by 16S, 606-bp 16S fragment, and *gyrB* analyses

Species (no. of strains)	Gene or protein (bp or aa) ^a	Haplotype no. (HGDI, S ² , SD) ^b	No. of SNPs or amino acid changes (divergence rate) ^c	No. of SNPs per strain (range [mean, mode])
<i>N. brasiliensis</i> (10)	606-bp 16S rRNA (571)	9 (0.978, 0.00292, 0.054)	15 (0.0–1.8) ^d	1–10 (4.5, 5) ^d
	16S (1,182)	10 (1.000, 0.00200, 0.045)	25 (0.2–1.5) ^d	0–1 (0.9, 1) ^d
	<i>gyrB</i> (756)	10 (1.000, 0.00200, 0.045)	51 (0.1–5.8) ^e	0–33 (14.4, 1) ^e
	GyrB (252)	5 (0.500)	19 ^e	0–18 (5.7, 6) ^e
<i>N. carnea</i> (10)	606-bp 16S rRNA (560)	10 (1.000, 0.00200, 0.0459)	7 (0.2–1.5) ^d	0–6 (3.3, 6) ^d
	16S (1,202)	9 (0.978, 0.00292, 0.054)	14 (0.1–0.8) ^d	0–6 (3.2, 2) ^d
	<i>gyrB</i> (735)	8 (0.956, 0.00353, 0.059)	211 (0.0–22.3) ^e	0–77 (37.0, 39) ^e
	GyrB (245)	7 (0.7)	61 ^e	0–50 (24.6, 24) ^e
<i>N. otitidiscaviarum</i> (10)	606-bp 16S rRNA (556)	1 (0,0,0)	0 ^d	0 (0, 0) ^d
	16S (1,208)	7 (0.911, 0.00598, 0.077)	10 (0.1–0.3) ^d	1–3 (1.8, 1) ^d
	<i>gyrB</i> (765)	5 (0.800, 0.01003, 0.100)	7 (0.0–0.5) ^e	1–2 (1.6, 2) ^e
	GyrB (255)	2 (0.2)	1 ^e	0–1 (0.1, 0) ^e
<i>N. transvalensis</i> (10)	606-bp 16S rRNA (551)	7 (0.911, 0.00598, 0.077)	18 (0.2–6.0) ^d	5–8 (6.1, 5) ^d
	16S (1,214)	7 (0.867, 0.01149, 0.107)	37 (0.0–1.6) ^d	16–26 (18.7, 18) ^d
	<i>gyrB</i> (771)	8 (0.933, 0.00597, 0.077)	150 (0.0–16.0) ^e	103–112 (108.3, 108) ^e
	GyrB (257)	6 (0.5)	55 ^e	62–69 (51.9, 51) ^e

^a aa, amino acid.

^b HGDI, Hunter and Gaston discrimination index; S², variance. For GyrB, only HGDI was calculated.

^c The divergence rate is expressed as a percentage for each group.

^d Changes in the 16S gene are shown with respect to *N. brasiliensis* DSM43758^T 16S (GenBank accession no. X80608), *N. carnea* strain DSM 43397^T 16S (NR_041859), *N. otitidiscaviarum* DSM 43242^T 16S (AF430067), and *N. transvalensis* DSM 43405^T 16S (NR_041867).

^e Changes in *gyrB* and GyrB are shown with respect to *N. brasiliensis* CDC<USA-GA>:W7503^T *gyrB* (GenBank accession no. GQ496125), *N. carnea* W8368^T *gyrB* (GQ984361), *N. otitidiscaviarum* CDC<USA-GA>:W8030^T *gyrB* (GQ496100), and *N. transvalensis* CDC<USA-GA>:W7518^T *gyrB* (GQ496089).

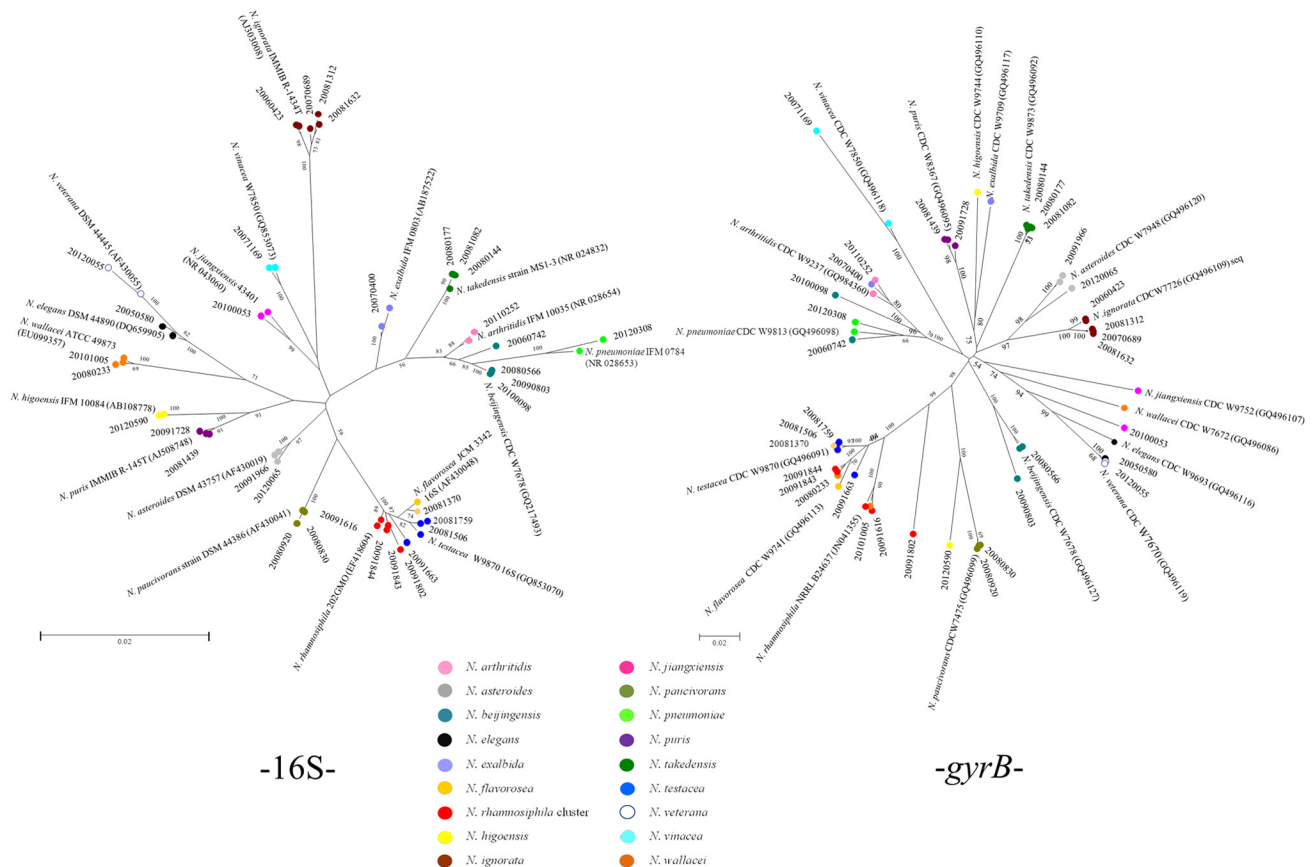


FIG 2 16S- and *gyrB*-based phylogenetic trees for the unusually reported species of *Nocardia* (neighbor-joining method). Each bootstrap value is expressed as a percentage of 1,000 replications. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

Nucleotide sequence accession numbers. The new 16S and *gyrB* sequences were deposited in GenBank under the accession numbers KP010715 through KP010826.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a grant to N.G. from the Instituto de Salud Carlos III (MPY-1446/11).

We are grateful to the CNM Biopolymers Unit for assistance in sequencing and Adrian Burton for language assistance. We are very grateful to the sample providers.

REFERENCES

1. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 19:259–282. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.2.259-282.2006>.
2. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gono T, Mikami Y. 2010. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol* 59:165–171. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.011346-0>.
3. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Villalón P, Medina-Pascual MJ, Sáez-Nieto JA. 2013. Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes. *J Clin Microbiol* 51:3602–3608. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00515-13>.
4. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. 2010. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48:4525–4533. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00883-10>.
5. Everest GJ, Cook AE, le Roes-Hill M, Meyers PR. 2011. *Nocardia rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. *Syst Appl Microbiol* 34:508–512. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.006>.
6. Moser BD, Klenk HP, Schumann P, Pötter G, Lasker BA, Steigerwalt AG, Hinrikson HP, Brown JM. 2011. *Nocardia niwae* sp. nov., isolated from human pulmonary sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:438–442. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.020370-0>.
7. Tamura T, Matsuzawa T, Oji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Katsumata H, Yamazoe A, Hamada M, Suzuki K, Gono T, Fujita N. 2012. A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102:481–491. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-012-9780-5>.
8. Kong F, Chen SC, Chen X, Sintchenko V, Halliday C, Cai L, Tong Z, Lee OC, Sorrell TC. 2009. Assignment of reference 5'-end 16S rDNA sequences and species-specific sequence polymorphisms improves species identification of *Nocardia*. *Open Microbiol J* 3:97–105. <http://dx.doi.org/10.2174/1874285800903010097>.
9. Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Brown-Elliott BA, Witebsky FG. 2008. *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., human pathogens and members of the “*Nocardia transvalensis* complex.” *J Clin Microbiol* 46:1178–1184. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02011-07>.
10. Chen KW, Lu CW, Huang TC, Lu CF, Liau YL, Lin JF, Li SY. 2013. Cutaneous manifestations of *Nocardia brasiliensis* infection in Taiwan during 2002–2012—clinical studies and molecular typing of pathogen by *gyrB* and 16S gene sequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:74–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.008>.

ARTÍCULO 2

Análisis de *gyrB* como herramienta para la identificación y filogenia de *Nocardia* spp.

“*gyrB* analysis as a tool for identifying *Nocardia* species and exploring their phylogeny”

Carrasco, G., Valdezate, S., Garrido, N., Medina-Pascual, M. J., Villalón, P., & Sáez-Nieto, J. A. (2015). *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 997–1001. <https://doi.org/10.1128/JCM.03072-14>

Epub 2014 Dec 24.

PMID: 25540402

Factor de Impacto 2015: 3.631

Cuartil: Q1

Número de citas: 1

- Aims and scope
- Fees and funding
- Language editing services
- Copyright**
- ▼ Preparing your manuscript
- Prepare supporting information
- Conditions of publication
- Editorial policies
- Peer-review policy
- Promoting your publication

Copyright

- Copyright on any open access article in a journal published by SpringerOpen is retained by the author(s).
- Authors grant SpringerOpen a [license](#) to publish the article and identify itself as the original publisher.
- Authors also grant any third party the right to use the article freely as long as its integrity is maintained and its original authors, citation details and publisher are identified.
- The [Creative Commons Attribution License 4.0](#) formalizes these and other terms and conditions of publishing articles.

In addition to SpringerOpen's copyright policy, some journals also follow an Open Data policy and the [Creative Commons CC0 1.0 Public Domain Dedication waiver](#) applies to all published data in these journals. Further information can be found on the individual journals pages and in the [license agreement](#).



Editorial Board

Sign up for article alerts and news from this journal

Annual Journal Metrics

Speed
79 days to first decision for reviewed manuscripts only

ARTÍCULO 3

Endoftalmitis causada por *Nocardia kruczakiae* en un paciente con una lesión ocular traumática.

“Traumatic endophthalmitis caused by *Nocardia kruczakiae* in a patient with traumatic eye injury”

Compte, R. B., Martínez-Osorio, H., Carrasco, G., Lorente, B., Elizalde, J., Valdezate, S., Lorente, R., Iglesias, E., & Saez-Nieto, J. A. (2015). *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 5(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12348-015-0067-7>

Epub 2015 Nov 25.

PMID: 26604206

Factor de Impacto 2015: 2.15

Cuartil: Q1

Número de citas: 5

BRIEF REPORT

Open Access



Traumatic endophthalmitis caused by *Nocardia kruczakiae* in a patient with traumatic eye injury

Rafael Barraquer Compte^{1,2}, Hernán Martínez-Osorio^{1,2*}, Gema Carrasco³, Betty Lorente^{1,2}, Javier Elizalde^{1,2}, Sylvia Valdezate³, Ramón Lorente⁴, Emilio Iglesias⁴ and Juan Antonio Saez-Nieto³

Abstract

Background: We describe a case of traumatic ocular endophthalmitis caused by *Nocardia kruczakiae* after vegetable trauma in an immunocompetent child.

Findings: A 5-year-old boy suffered from a trauma with a palm tree leaflet. Two months later, he was diagnosed with traumatic infectious uveitis and intumescent cataract with anterior capsule rupture. Intensive treatment with systemic and topical vancomycin, ceftazidime and methylprednisolone began. After 1 month, he underwent phacoemulsification with intraocular lens implantation (IOL).

After some episodes of reactivation, he was diagnosed with traumatic nocardial endophthalmitis from aqueous humour samples. Several operations and specific antibiotic therapy resolved the infection.

Conclusions: In cases of traumatic endophthalmitis and several recurrences, it is extremely useful to make an etiologic diagnosis in order to treat the patient with specific antibiotics.

Keywords: *Nocardia kruczakiae*, Bacterial endophthalmitis, Multi-targeted identification

Findings

A 5-year-old boy suffered trauma in his left eye (OS) by a palm tree leaflet in October 2009. Two months later, he was diagnosed with traumatic infectious uveitis and intumescent cataract with anterior capsule rupture. Treatment with systemic and topical vancomycin, ceftazidime and methylprednisolone began. In January 2010, the patient underwent phacoemulsification with intraocular lens implantation (IOL). Aqueous humour samples were cultured with negative results. Every reduction in treatment led to several episodes of anterior uveitis. Inflammation continued although systemic and topical clarithromycin plus antimycotic treatment and antiglaucoma eye drops were prescribed.

The patient was admitted to our centre (*Centre Oftalmología Barraquer*) in July 2010. He was being treated with topical dexamethasone, atropine, ciprofloxacin,

voriconazole and antiglaucoma eye drops: oral acetazolamide, deflazacort, fluconazole, omeprazole and calcium carbonate/colecalciferol. Visual acuity (VA) was 0.95 in the right eye and 0.1 in the OS. Examination revealed yellowish nodules above the iris and IOL (Fig. 1). Ultrasounds only revealed a slight inflammatory reaction. The patient's medical history was unremarkable. Anterior vitrectomy and IOL and capsular bag removal were performed, adding intraocular vancomycin and ceftazidime injection. The latter treatment was continued and oral clarithromycin restarted. Now, the aqueous humour culture showed an aerobic gram-positive bacillus compatible with Actinomycetes. Antimycotic treatment was stopped, and topical polymyxin B plus trimethoprim and oral trimethoprim/sulphamethoxazole were therefore provided. Two weeks after vitrectomy, the patient showed reduction of inflammation, but retinal detachment with macular involvement was diagnosed. Scleral buckling, endophotocoagulation and pneumatic retinopexy were performed.

The Actinomycetes was further identified and antimicrobial susceptibility tested [1]. The 16S RNA, 65-kDa

* Correspondence: hernanophth@hotmail.com

¹Centro de Oftalmología Barraquer, Muntaner 314, 08021 Barcelona, Spain

²Institut universitari Barraquer, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

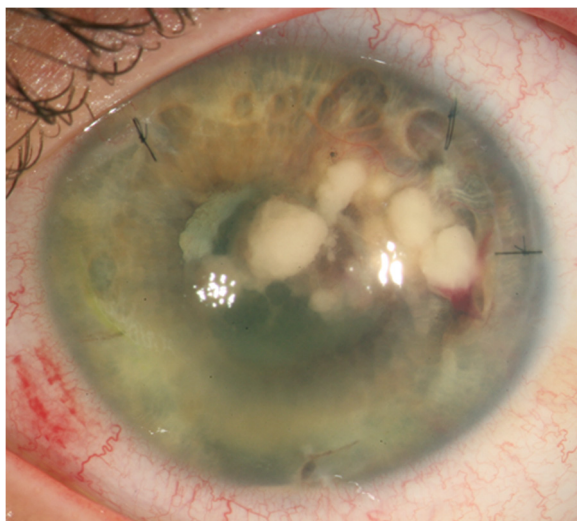


Fig. 1 Left eye *N. kruczakiae* endophthalmitis. The slit lamp examination shows yellowish nodules in anterior chamber above iris and intraocular lens

heat-shock protein (*hsp65*), β -subunit type II DNA topoisomerase (*gyrB*) and RNA polymerase subunit β (*rpoB*) genes were examined [2–4]. Sequences were compared with those in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and Bacteria Identification Bioinformatics

(BIBI) databases (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>). Similarities of $\geq 99.0\%$ were deemed to denote the same species.

In terms of 16S, the bacterium was most similar (99.0 %) to *Nocardia nova* IFM 0272. Similarity with *N. nova* DSM 44481 and DSM 43207 [5] was lower at 98.7 %. Ninety-eight percent similarity was detected with the sequences for *Nocardia africana*, *Nocardia aobensis*, *Nocardia cerradoensis*, *Nocardia kruczakiae* and *Nocardia veterana*. The *hsp65* gene showed 99 % similarity with respect to those of *N. aobensis* DSM 44805, *N. nova* DSM 44481, *N. veterana* NRRL B-24136 and *N. kruczakiae* DSM 44877 [5].

The *gyrB* gene was most similar (99 %) to that of *N. kruczakiae* W9710/DSM 44877, *N. aobensis* DSM 44805 and *N. cerradoensis* W8368 [3]. Among four detected polymorphisms (*N. kruczakiae* DSM 44877 numbering), one produces the replacement Trp(TGG) \rightarrow Cys(TGC). A fully matching *rpoB* sequence was obtained with *N. kruczakiae* DSM 44877. Similarity fell to 99 % with respect to *N. aobensis* DSM 44805 and *N. cerradoensis* DSM 44546 and to 98 % with respect to *N. nova* OAHPP13857-1633 [5]. The studied bacterium, CNM997/10, was therefore identified as *N. kruczakiae*. The sequences were deposited in GenBank under accession numbers JX443642–JX443645.

Table 1 Antimicrobial susceptibility of *N. kruczakiae* CNM997/10, the causal agent of endophthalmitis in the present patient

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Susceptibility ^b	Resistance breakpoint ^c
Primary ^c			
Amikacin	0.19	S	≥ 16
Amoxicillin/clavulanic acid	≥ 256	R	$\geq 32/16$
Ciprofloxacin	≥ 32	R	≥ 4
Clarithromycin	0.5	S	≥ 8
Imipenem	0.5	S	≥ 16
Linezolid	1	S	≤ 8
Trimethoprim/sulphamethoxazole	2/38	S	$\geq 4/76$
Tobramycin	≥ 256	R	≥ 16
Others ^{c,d}			
Ampicillin	≥ 256	R	≥ 32
Cefotaxime	≥ 32	R	≥ 64
Meropenem	8	–	Na
Gentamicin	8	I	≥ 16
Tetracycline	≥ 256	–	Na
Chloramphenicol	≥ 256	–	Na
Clindamycin	0.03	S	≥ 4
Quinupristin/dalfopristin	≥ 32	–	Na
Vancomycin	≥ 32	–	Na
Teicoplanin	≥ 256	–	Na

^aMinimum inhibitory concentration; ^bS and R, susceptible and resistant; ^cResistance and susceptibility breakpoints are those recommended by the CLSI 2011 M24-A2, and ^dby the NCCLS 2003 M24-A; Na, not available

Ocular inflammation resolved after 2 months with specific treatment. Two months after retinal surgery, the patient underwent iris reconstruction, secondary IOL fixation and Ahmed valve implantation. VA improved to 0.2. Three years after treatment discontinuation, no inflammation was observed.

Discussion

Ocular infections caused by *Nocardia* species previously unknown in immunocompetent patients have recently been reported [6, 7]. The cornea and anterior chamber of the eye are immune-privileged tissues; this may explain the appearance of ocular infections or surgically related endophthalmitis in such patients [6, 8].

This report describes an immunocompetent child who suffered ocular trauma by a palm tree leaflet inoculating *N. kruczakiae*. Nocardial infection should be considered in patients with such plant-inflicted trauma since 31–67 % of postoperative nocardial endophthalmitis have occurred in those living in rural areas [6, 9]. Initial management with rounds of corticosteroids probably encouraged chronic infection. Long corticosteroid treatment predisposes patients to nocardial endophthalmitis [9]. A large proportion of patients (75–83 %) show nodules on the corneal endothelium or on the iris; however, the posterior segment is usually normal or only slightly involved [6, 9]. Surgical procedures are frequently used to eradicate nocardial endophthalmitis. The outcome of nocardial endophthalmitis can be poor due to its delayed presentation and extensive involvement of the anterior chamber. The present patient showed an improvement to a VA of 0.2 OS from 0.1, despite late diagnosis and the retinal detachment that occurred after IOL removal.

N. kruczakiae is difficult to distinguish from *N. africana*, *N. nova* and *N. veterana* by phenotyping [2] but can be identified by molecular technique even when the samples available are very small and patients have undergone treatment with antibiotics [7, 10]. 16S analysis commonly provides a definitive identification, but certain closely related species cannot be differentiated, a consequence of the low level of interspecies polymorphism and the existence of multiple and different copies of 16S in *N. nova* [11, 2]. Indeed, several species, such as *N. africana*, *N. aobensis*, *N. cerradoensis*, *N. nova*, *N. kruczakiae* and *N. veterana*, cluster together even when examined by multilocus sequence typing [5].

The *rpoB* and *gyrB* genes are known to show greater diversity than 16S and *hsp65* and therefore allow for more precise identification [5]. Those of the causal agent were found similar (100 and 99.3 %, respectively) to those of the *N. kruczakiae* DSM 44877, confirming that it belonged to this specie.

N. kruczakiae CNM997/10 also showed the same susceptibility profile to that first described for *N. kruczakiae*

ATCC BAA-280 [2], except for ampicillin (Table 1). Treatment with amikacin, clarithromycin, imipenem, linezolid and trimethoprim/sulphamethoxazole would therefore appear appropriate.

The suggested empirical treatment for severe ocular bacterial infections is topical and intravitreal vancomycin and ceftazidime [12]. Unfortunately, this led to the recurrence of iris nodules in this patient. His endophthalmitis was finally brought under control after surgical removal of the lens-bag complex with associated inflammatory materials, which allowed the detection of *N. kruczakiae*. Specific treatment for 8 weeks resolved the condition.

N. kruczakiae, previously described as a causal agent of pneumonia [2], is reported here as the causal agent of ocular endophthalmitis. Ophthalmologists should be aware of infections caused by *Nocardia* and suspect nocardial endophthalmitis after plant-inflicted trauma.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

RIB, HM, GC, BL, JE, SV, RL, EI, JAS: Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; and drafting the work or revising it critically for important intellectual content; and final approval of the version to be published; and agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgements

We thank Bachar Kudsieh and Alfredo Corell for providing diagnostic and treatment information.

Financial support

This research was supported by grant MPY 1446/11-TE from the *Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III*.

Author details

¹Centro de Oftalmología Barraquer, Muntaner 314, 08021 Barcelona, Spain. ²Institut universitari Barraquer, Barcelona, Spain. ³Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain. ⁴Servicio de Oftalmología, Complejo Hospitalario Universitario, Ourense, Spain.

Received: 24 March 2015 Accepted: 16 November 2015

Published online: 25 November 2015

References

1. Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (2011). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes. In: Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Approved standard 2nd edn. CLSI document M24-A2.
2. Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Anderson VL, Fishbain JT, Holland SM, Witebsky FG (2004) *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "N. nova complex". *J Clin Microbiol* 42:5139–5145
3. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gonoi T, Mikami Y (2010) Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol* 59:165–171
4. Oh WS, Ko KS, Song JH, Lee MY, Ryu SY, Taek S, Heo ST, Kwon KT, Lee JH, Peck KR, Lee NY (2005) Catheter-associated bacteremia by *Mycobacterium senegalense* in Korea. *BMC Infect Dis* 5:107

5. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX (2010) Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48:4525–4533
6. Decroos FC, Garg P, Reddy AK, Sharma A, Krishnaiah S, Mungale M, Mruthyunjaya P, Hyderabad Endophthalmitis Research Group (2011) Optimizing diagnosis and management of *Nocardia* keratitis, scleritis, and endophthalmitis: 11-year microbial and clinical overview. *Ophthalmology* 118:1193–1200
7. Reddy AK, Garg P, Kaur I (2010) Speciation and susceptibility of *Nocardia* isolated from ocular infections. *Clin Microbiol Infect* 16:1168–1171
8. Taylor AW (2009). Ocular immune privilege. *Eye*. (Lond), 1885-9.
9. Haripriya A, Lalitha P, Mathen M, Prajna NV, Kim R, Shukla D, Natchiar G, Srinivasan M (2005) *Nocardia* endophthalmitis after cataract surgery: clinicomicrobiological study. *Am J Ophthalmol* 139:837–846
10. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ Jr (2006) Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 19:259–282
11. Conville PS, Witebsky FG (2005) Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *J Clin Microbiol* 43:2881–2885
12. Abbott RL, Zegans M, Kremer PA (2006) Bacterial corneal ulcers. In: Tasman W, Jaeger EA (eds) *Duane's clinical ophthalmology* on CD-ROM. Williams & Wilkins, Philadelphia, PA: Lippincott

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

Frontiers Copyright Statement

All content included on Frontiers websites (including Loop), such as text, graphics, logos, button icons, images, video/audio clips, downloads, data compilations and software, is the property of Frontiers if created by Frontiers, or of the person or entity who or which owned it prior to submission to Frontiers. If not owned by Frontiers, it is licensed to Frontiers Media SA (Frontiers) or its licensees and/or subcontractors.

The copyright in the text of individual articles (including research articles, opinion articles, book reviews, conference proceedings and abstracts) is not the property of Frontiers, and its ownership is not affected by its submission to or publication by Frontiers. Frontiers benefits from a general licence over all content submitted to it, and both Frontiers and its users benefit from a [Creative Commons CC-BY licence](#) over all content, as specified below.

Images and graphics not forming part of user-contributed materials are the property of or are licensed to Frontiers may not be downloaded or copied without Frontiers' explicit and specific permission or in accordance with any specific copyright notice attached to that material.

The combination of all content on Frontiers websites, as well as the design and the look and feel of the Frontiers websites, and the copyright and all other rights in such content and combination, are the sole property of Frontiers.

As an author or contributor you grant permission to others to reproduce your articles, **including any graphics and third-party materials supplied by you**, in accordance with the [Frontiers Terms and Conditions](#). The licence granted to third parties over all contents of each article, **including third-party elements**, is a Creative Commons Attribution ("CC BY") licence. The current version is [CC-BY, version 4.0](#), and the licence will automatically be updated as and when updated by the Creative Commons organisation.

You may include a requirement to reproduce copyright notices in materials contributed by you, but you may not restrict the right to reproduce the entire article, including third-party graphics. This means that you must obtain any necessary third-party consents and permissions to reproduce third-party materials in your articles submitted to Frontiers.

ARTÍCULO 4

Limitaciones de la base de datos comercial de MALDI-TOF MS y empleo del esquema MLSA como árbitro en la identificación de especies del género *Nocardia*

“Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter
in the Identification of *Nocardia* Species”

Carrasco, G., de Dios Caballero, J., Garrido, N., Valdezate, S., Cantón, R., & Sáez-Nieto, J. A.
(2016). *Frontiers in Microbiology*, 7, 542. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00542>

Epub 2016 Apr 21.

PMID: 27148228

Factor de Impacto 2016: 4.165

Cuartil: Q1

Número de citas: 12



Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter in the Identification of *Nocardia* Species

Gema Carrasco¹, Juan de Dios Caballero², Noelia Garrido¹, Sylvia Valdezate^{1*}, Rafael Cantón² and Juan A. Sáez-Nieto¹

¹ Área de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, ² Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

David W. Graham,
Newcastle University, UK

Reviewed by:

Ying Zhou,
AmberGen Inc., USA
Marcos Quintela-Balaja,
Newcastle University, UK

*Correspondence:

Sylvia Valdezate
svaldezate@isciii.es

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 26 November 2015

Accepted: 04 April 2016

Published: 21 April 2016

Citation:

Carrasco G, de Dios Caballero J,
Garrido N, Valdezate S, Cantón R
and Sáez-Nieto JA (2016)
Shortcomings of the Commercial
MALDI-TOF MS Database and Use
of MLSA as an Arbiter
in the Identification of *Nocardia*
Species. *Front. Microbiol.* 7:542.
doi: 10.3389/fmicb.2016.00542

Nocardia species are difficult to identify, a consequence of the ever increasing number of species known and their homogeneous genetic characteristics. 16S rRNA analysis has been the gold standard for identifying these organisms, but proteomic techniques such as matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF MS) and housekeeping gene analysis, have also been explored. One hundred high ($n = 25$), intermediate ($n = 20$), and low ($n = 55$) prevalence (for Spain) *Nocardia* strains belonging to 30 species were identified via 16S rRNA and MALDI-TOF MS analysis. The manufacturer-provided database MALDI Biotyper library v4.0 (5,627 entries, Bruker Daltonik) was employed. In the high prevalence group (*Nocardia farcinica*, *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica* and *N. nova*), the 16S rRNA and MALDI-TOF MS methods provided the same identification for 76% of the strains examined. For the intermediate prevalence group (*N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. otitidiscaviarum* and *N. transvalensis* complex), this figure fell to 45%. In the low-prevalence group (22 species), these two methods were concordant only in six strains at the species level. Tetra-gene multi-locus sequencing analysis (MLSA) involving the concatemer *gyrB*-16S rRNA-*hsp65*-*secA1* was used to arbitrate between discrepant identifications ($n = 67$). Overall, the MLSA confirmed the results provided at species level by 16S rRNA analysis in 34.3% of discrepancies, and those provided by MALDI-TOF MS in 13.4%. MALDI-TOF MS could be a strong candidate for the identification of *Nocardia* species, but only if its reference spectrum database improves, especially with respect to unusual, recently described species and species included in the described *Nocardia* complexes.

Keywords: *Nocardia* spp., MALDI-TOF MS, 16S rRNA identification, MLSA, prevalence in Spain

INTRODUCTION

The members of *Nocardia* are branched Gram-positive opportunistic pathogens that live in soils rich in organic matter. Nearly 90 species (Euzebey, 2013) cause clinical problems, including cutaneous respiratory and systemic disease. Over 85% of all *Nocardia* species were identified during the molecular era; previously, time-consuming phenotypic tests were used (Brown-Elliott et al., 2015). Nowadays, the sequencing of the 16S rRNA gene is the most

widespread method (Brown-Elliott et al., 2015). However, other techniques based on protein profiling, such as matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), have increased their throughput and potential use (Singhal et al., 2015) and have been shown useful in the routine laboratory identification of *Nocardia* (Carbonnelle et al., 2010).

Unfortunately, the MALDI-TOF MS identification harbors limitations when only manufacturer-provided database has been applied. It was stated in a literature review displaying low values of correct *Nocardia* species assignment ($\approx 15\text{--}53\%$) (Xiao et al., 2016). In addition, the constantly increasing number of, recognized *Nocardia* species means that the commercial MALDI-TOF MS spectrum database for the genus can become outdated. Both facts made that requiring laboratories to compile their own libraries to get a successful identification (Brown-Elliott et al., 2015; Buckwalter et al., 2016). However, this step could not be feasible for many of the routine clinical laboratories, in which MALDI-TOF MS has been widely introduced.

To achieve a successful species assignment in this genus, molecular techniques as full-length 16S rRNA gene or multi-locus sequence analysis (MLSA) have been undergone. Both are high cost techniques that need on-site sequencing facilities, not being available in most of the clinical laboratories (Xiao et al., 2016).

The present work compares the agreement between 16S rRNA full gene and MALDI-TOF MS identification of *Nocardia* species by using the current commercial database without in-house supplementation (MALDI Biotyper software package version 3.1) and identifies the shortcomings of the latter. This analysis has been performed in a wide population of clinical *Nocardia* strains constituted by species with different prevalence in Spain. The tetra-gene MLSA (McTaggart et al., 2010) involving the concatemer *gyrB*-16S rRNA-*hsp65*-*secA1* was used to arbitrate between discrepant identifications.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Amplifications, and Sequencing

The bacteria examined in this work were 100 *Nocardia* strains recovered from clinical samples (84 of respiratory origin, 6 cutaneous, 2 from the central nervous system and 8 from other tissues) sent to our reference centre (Spanish National Centre for Microbiology) from different hospitals between 2006 and 2014. These were identified by 16S rRNA analysis (see below) as representing 30 *Nocardia* species, and were selected for the present study since they represented more and less commonly encountered members of the genus. All these bacteria were incubated on buffered charcoal yeast extract agar (BCYE) or Columbia 5% sheep blood agar at 37°C for at least 48 h (i.e., until growth was clearly visible). DNA was extracted by the boiling method and amplifications of the studied genes were performed using Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). The products were electrophoresed and purified using Exo SAP-ITTM reagent (GE Healthcare, NJ, USA), and sequenced

by capillary electrophoresis in a ABI PRISM 3100 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Carrasco et al., 2013) PCR primers and conditions are listed in Supplementary Table S1.

16S rRNA Analysis

The received *Nocardia* strains were identified at the species level by sequencing of the full-length 16S rRNA gene (size ~ 1215 bp) (with proofreading and editing as necessary). The obtained sequences were compared with those in the GenBank database; those showing $\geq 99.6\%$ similarity were deemed to be the same and thus positively identified following CLSI MM18 guidelines (Petti et al., 2008).

The BioEdit (Hall, 1999), CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), and Mega 6.0 computer programs were used to construct a 16S rRNA phylogenetic tree (Tamura et al., 2013), employing the neighbor joining method (Gascuel, 1997) and Kimura 2 parameter distances (Kimura, 1980) (Figure 1). The reliability of the topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates.

Three groups were established according to the prevalence of *Nocardia* species in Spain (Carrasco et al., 2013): 25 strains representing *Nocardia abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* and *N. nova* were assigned to the high prevalence group, 20 strains representing *N. brasiliensis*, *N. carneae*, *N. otitidiscalearum*, and the *N. transvalensis* complex were assigned to the intermediate prevalence group, and 55 (representing 22 less frequently detected species) to the low prevalence group.

MALDI-TOF MS Identification

Protein samples were initially prepared as previously described (Verroken et al., 2010). As seen with *Mycobacterium* spp., the analysis of *Nocardia* by MALDI-TOF MS requires somewhat complicated sample preparation (Dunne et al., 2014) due to the presence of aliphatic acids in the cell wall (Xiao et al., 2016). Despite this fact, three modifications of this extraction technique were used (see Supplementary File S1): (i) mechanical disruption with glass-beads; (ii) 10 min of sonication at 2500 oscillation min⁻¹ using a Mini Bead Beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) (both of these options preceding the rest of the Verroken et al. method); and (iii) freezing for 24 h before proceeding to protein extraction (performed after the boiling step described in the Verroken et al. method).

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight spectra were randomly obtained from blind samples in the linear positive mode at a laser with a frequency of 20 Hz in the range of 2–20 kDa with a Microflex X instrument using the FlexControl 3.3 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Each recorded spectrum is the result of six series of 40 single laser shots in different locations, with user intervention only when needed. Raw spectra of bacteria were explored using the MALDI Biotyper 3.1 software package with default settings. The database for identification was the reference Biotyper library v4.0 5.627 MSP (Bruker Daltonik). In 2014, 5627 species were included in this database (Piau et al., 2015). Identification was performed with no custom database supplementation. Identification scores (MALDI-TOF MS log scores) of ≥ 2.0 and

TABLE 1 | Level of agreement between 16S rRNA and commercial MALDI-TOF MS database (Bruker Biotyper library v.4.0) identification of *Nocardia* species.

<i>Nocardia</i> spp. (no. of strains)	Agreement between 16S and MALDI-TOF MS	No. of strains in the Bruker database
High prevalence (n = 25)		
<i>Nocardia abscessus</i> (n = 2)	2/2	2
<i>N. cyriacigeorgica</i> (n = 6)	5/6	16
<i>N. farcinica</i> (n = 8)	7/8	12
<i>N. nova</i> (n = 9)	5/9	2
Total (%)	19/25 (76.0%)	32
Intermediate prevalence (n = 20)		
<i>N. brasiliensis</i> (n = 5)	3/5	1
<i>N. carnea</i> (n = 7)	1/7	1
<i>N. otitidiscaviarum</i> (n = 5)	5/5	6
<i>N. transvalensis</i> complex (n = 3)	0/3	1
Total (%)	9/20 (45%)	9
Low prevalence (n = 55)		
22 <i>Nocardia</i> species:	5/55	45
-13 <i>Nocardia</i> species included in Bruker database (n = 28)	5/23	45
-9 <i>Nocardia</i> species not included in Bruker database (n = 27)	0	0
Total (%)	5/55 (9.1%)	45

RESULTS

Identification of *Nocardia* Species via MALDI-TOF MS, Resolving Discrepancies by MLSA

Table 1 shows the degree of overall agreement between 16S and MALDI-TOF MS identification with manufacturer-provided database (MALDI Biotyper library v4.0), and that within each prevalence group according to its frequency in Spain (Carrasco et al., 2013). The 16S rRNA method identified 79 out of 100 studied strains at the species level (Petti et al., 2008); 13 could only be identified as *Nocardia* spp. Similarity values of 99.0–99.5% were obtained for eight strains, not enough to assign them to any *Nocardia* species, although they can be assumed to belong to different *Nocardia* complexes (Schlaberg et al., 2013).

For the 33 strains with *concordant* 16S rRNA and MALDI-TOF MS identifications at species level, the percentage similarity of the MLSA concatemer for each strain with respect to the reference sequences in GenBank reached 93.8–98.7%, 90.7–97.4%, and 90.1–100% for the high, intermediate and low-prevalence subgroups, respectively.

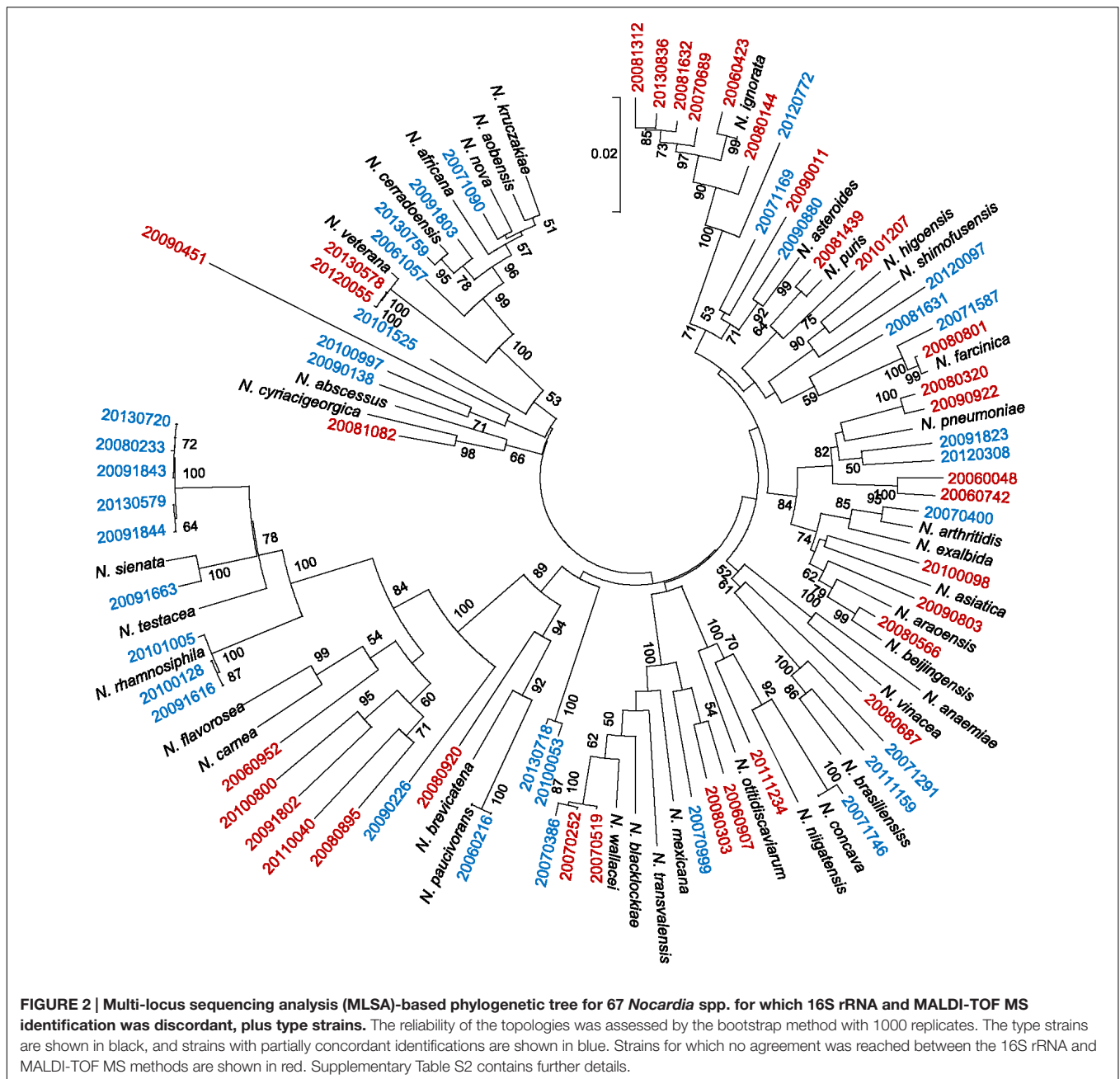
For the 67 strains, *not concordant* in the identification made by the 16S rRNA and MALDI-TOF MS methods, MLSA was performed. Among them, 34 strains were *concordant* in genus but discrepantly identified at the species level by the 16S rRNA and MALDI-TOF MS. Their percentage similarities of the MLSA concatemer for each strain with respect to the reference sequences for high, intermediate and low-prevalence subgroups were of

94.4–98.9%, 96.9–97.6%, and 94.4–100.0%, respectively. MLSA confirmed 7 identifications made by 16S rRNA and 9 identifications made by MALDI-TOF MS (Supplementary Table S2).

Further 33 strains –25 from the low prevalent group– were *not concordant* even at genus level by 16S rRNA and MALDI-TOF MS. MLSA confirmed 16 identifications made by 16S rRNA and none identification was made by MALDI-TOF MS, as is shown in Supplementary Table S2. Their percentage similarities of the MLSA concatemer for each strain with respect to the reference sequences for high, intermediate and low-prevalence subgroups were of 99.8% (there was one strain only), 91.2–96.1 and 94.7–99.4%, respectively (Supplementary Table S2). *N. ignorata* was excluded from analysis given the strong presence of degenerate positions in the reference strain partial 16S rRNA gene (*N. ignorata* IMMIB R-1434T; GenBank accession no. AJ303008).

Identification of *Nocardia* High Prevalence Group

With respect to the high prevalence group, agreement between the 16S rRNA and MALDI-TOF MS methods was reached for 19 of the 25 strains examined. However, agreement was complete only for the two strains of *N. abscessus*. One of the six discrepant strains (identified as *N. farcinica* by 16S rRNA) was not identified even at genus level by the MALDI-TOF but laid together with its respective type strain in the MLSA tree. Among the five remaining strains, only one identification was confirmed by MLSA (Figure 2).



Identification of *Nocardia* Intermediate Prevalence Group

The agreement between the 16S rRNA and MALDI-TOF MS methods was reached for 9 of the 20 strains examined. However, while this agreement was complete only for the strains of *N. otitidiscaviarum*, no agreement was reached for any strain of the *N. transvalensis* complex. For the 11 strains with discrepant identification, good discrimination was reached by MLSA for *N. brasiliensis*, but not *N. transvalensis* complex. In addition, MLSA was unable to distinguish between *N. carnea* and *N. flavorosea* (Figure 2).

Identification of *Nocardia* Low Prevalence Group

16S rRNA and MALDI-TOF MS analysis only agreed in the species identification of just five strains in this group: 2 out of 4 examples of *N. asteroides*, 1 out of 1 example of *N. higoensis*, 1 out of 2 of *N. paucivorans*, and 1 out of 2 *N. testacea*. For 25 of the total of 55 strains of this group, it was able to confirm their belonging to the genus *Nocardia*, but not for further 25 strains.

Only 13 of the 22 species in the low prevalence group include their mass spectra (MS) in the Bruker database v 4.0 (1–3 MS profiles per species), covering 23 out of 50 of the non-concordant strains of this group. With respect to

the 13 species that were covered by the Bruker database, MLSA provided confirmation in the identifications at species level of 15 strains made by 16S rRNA analysis (MALDI-TOF MS only provided identification for 4 strains). Indeed, for *N. cerradoensis*, *N. ignorata*, and *N. pneumoniae*, MLSA provided very good discrimination. MLSA was not able to confirm the 16S rRNA identifications of *N. wallacei* or *N. blacklockiae* (MALDI-TOF MS only provided unreliable alternative identifications). MLSA tree was unable to distinguish between *N. brevicatena*/*N. paucivorans*, *N. arthritidis*/*N. exalbida*, and *N. kruckzakiae*/*N. aobensis*/*N. africana*/*N. nova*, as identified by 16S rRNA (again, MALDI-TOF MS only provided unreliable alternative identifications with log scores <1.7).

Among the *Nocardia* strains belonging to non-covered species by MALDI-TOF v.4.0 library ($n = 27$), MLSA tree confirmed the identity of three strains – *N. puris*, *N. rhamnosiphila*, and *N. shimofusensis* – previously identified by the 16S rRNA method, but not by MALDI-TOF MS (Figure 2). No spectra were available in the Bruker database for *N. beijingensis*, *N. flavorosea*, and *N. wallacei* strains either, but these did locate to the same MLSA branch as their corresponding reference sequence, thus confirming to some degree their 16S rRNA identifications. No MLSA confirmation could be made for the *N. vinacea* strains identified as such by 16S rRNA analysis or as *N. aobensis* by MALDI-TOF MS. When no pattern for a *Nocardia* sp. type strain was available, only one strain returned a MALDI-TOF MS log score of ≥ 2.0 allowing its identification at the species level. Two of the strains with discrepant identifications, but with MALDI-TOF MS log scores of 1.7–2.0, were identified by the latter as outside of the *Nocardia* genus. It is noteworthy that MALDI-TOF MS identified 11 *Nocardia* strains as *Lactobacillus* spp., one with a log score of 1.989 (Supplementary Table S2). However, four of the latter 11 strains also received an alternative identification as belonging to the genus *Nocardia* (log score range 1.16–1.42).

Of the 13 strains identified as belonging only to *Nocardia* sp. plus a type strain specification by the 16S rRNA method (with 99.6% similarity to their comparators in the GenBank database), although not identified as such by MALDI-TOF MS with the current commercial database, six were fully identified at the species level by the MLSA tree. Two strains with a 16S rRNA-derived similarity of 99.0 and 99.5% to *N. pneumoniae* clustered in the MLSA phylogenetic tree with the *N. pneumoniae* DSM 44730 reference strain (GenBank accession no. JF797313). Besides, one *Nocardia* sp. strain unreliably identified by MALDI-TOF MS as *N. paucivorans* – but not identified as such by 16S rRNA – clustered with *N. paucivorans* DSM 44386 (GenBank accession number AF430041) in the MLSA tree.

DISCUSSION

The MALDI-TOF MS method would appear to have a number of shortcomings with respect to the identification of *Nocardia* species. The Verroken et al. (2010) protein extraction protocol

appears to be adequate but not for all the strains. When the unmodified method was used, 81 of the 100 strains were assigned an identification (though not necessarily correct). When those strains for which no identification was given were re-tested with either the additional glass bead, the sonication, or the 48 h freezing step, serviceable extracts were achieved for a further 10, 5, and 4 strains, respectively.

The agreement values reported by MALDI-TOF MS in an earlier study involving Gram-positive bacilli such as *Lactobacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Rhodococcus* spp. reached a much higher $\geq 80\%$ (Farfour et al., 2012). However, less agreement was seen for 15 *Kocuria* (26.7%) and 74 *Nocardia* strains (14.9%) (Hsueh et al., 2014). Other authors have also indicated the inadequacy of the Bruker database for identifying *Nocardia* species, leading to identification agreements between the 16S rRNA and MALDI-TOF MS methods of just 15.6% (Segawa et al., 2015), 53.0% (Khot et al., 2015), 42.0% (Buckwalter et al., 2016), and none (Xiao et al., 2016) at the species level. However, these values were improved to 90.6, 83.1, 90.0 and 95.0%, respectively, when in-house libraries with custom spectra were included.

The present results reveal the relatively poor agreement between the two methods in terms of *Nocardia* identification at the species level. While agreement was reached for 76% of the high-prevalence group species, this figure fell to 45 and 9.1%, for those of the intermediate and low prevalence groups, respectively. The small number of MSs in the Bruker database for the high (especially for *N. nova*) and intermediate (especially for *N. carnea* and *N. transvalensis* complex) prevalence species, and for unusual and recently described species, renders the method unreliable because of the lack of identification by MALDI-TOF MS with the commercial v. 4.0 database. Moreover, in the present study, the identification of >10% of the examined strains as members of *Lactobacillus* sp., as previously reported (Hsueh et al., 2014), is of particular concern.

When identifications were discrepant in *Nocardia* species, the MLSA method was used as an arbiter, to resolve the phylogenetic resolution at the species level (Glaeser and Kämpfer, 2015). When a discrepantly identified strain clustered with a type strain in the MLSA phylogenetic tree this allowed its final identification to be made (Vasileuskaya-Schulz et al., 2011). A problem with MLSA is the inexistence of identification breakpoints when using the present concatenated sequence. In addition, there is no consensus housekeeping gene system for use with *Nocardia* species, nor have codes been assigned to alleles, nor does any sequence database exist. Even so, it is the best method available for identifying *Nocardia* species, but much more expensive and laborious than 16S rRNA or MALDI-TOF MS. It is not, therefore, routinely used in health laboratories.

CONCLUSION

Until the Bruker database is amplified, the MALDI-TOF MS platforms with the Bruker Biotyper library v.4.0 cannot be

considered a reliable technique as a routine method for resolving *Nocardia* sp. identification. It is specially meaningful for those unusual species -intermediate and low prevalence groups-, newly described and species included the *Nocardia* complexes. Until this occurs, health laboratories should consider retaining the use of the full-length 16S rRNA gene sequencing and the reference laboratories should confirm by MLSA this identification.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GC contributed to the study design, the acquisition, analysis, and interpretation of data, and drafting the manuscript. SV, RC, and JS contributed to the study design, the interpretation of data and revising the manuscript. JC and NG contributed to the acquisition of data. All the authors have read and approved the final draft before submission.

REFERENCES

- Brown-Elliott, B. A., Conville, P., and Wallace, R. J. (2015). Current status of *Nocardia* taxonomy and recommended identification methods. *Clin. Microbiol. Newsl.* 37, 25–32. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.01.007
- Buckwalter, S. P., Olson, S. L., Connelly, B. J., Lucas, B. C., Rodning, A. A., Walchak, R. C., et al. (2016). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes. *J. Clin. Microbiol.* 54, 376–384. doi: 10.1128/JCM.02128-15
- Carbannelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., et al. (2010). MALDI-TOF MS mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* 44, 104–109. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017
- Carrasco, G., Valdezate, S., Garrido, N., Villalón, P., Medina-Pascual, M. J., and Sáez-Nieto, J. A. (2013). Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3602–3608. doi: 10.1128/JCM.00515-13
- Dunne, W. M. Jr., Doing, K., Miller, E., Miller, E., Moreno, E., Baghli, M., et al. (2014). Rapid inactivation of *Mycobacterium* and *Nocardia* species before identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3654–3659. doi: 10.1128/JCM.01728-14
- Euzeby, J. P. (2013). *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 236. Available at: <http://www.bacterio.net>
- Farfour, E., Leto, J., Barritault, M., Barberis, C., Meyer, J., Dauphin, B., et al. (2012). Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2702–2707. doi: 10.1128/JCM.00368-12
- Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808
- Glaeser, S. P., and Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA). in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 237–245. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.007
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hsueh, P. R., Lee, T. F., Du, S. H., Teng, S. H., Liao, C. H., and Sheng, W. H. (2014). Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2371–2379. doi: 10.1128/JCM.00456-14

FUNDING

This work was funded by a grant to NG from the Instituto de Salud Carlos III (MPY 1278/15).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the CNM Biopolymers Unit for help in sequencing, to Adrian Burton for language and editing assistance, and to the health laboratories that provided the *Nocardia* strains examined.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00542>

- Khot, P. D., Bird, B., Durrant, R., and Fisher, M. A. (2015). Identification of *Nocardia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3366–3369. doi: 10.1128/JCM.00780-15
- Kimura, M. (1980). A Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120. doi: 10.1007/BF01731581
- Liu, W. L., Lai, C. C., Ko, W. C., Chen, Y. H., Tang, H. J., Huang, Y. L., et al. (2011). Clinical and microbiological characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study from 1998 to 2010. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 1341–1347. doi: 10.1007/s10096-011-1227-9
- McTaggart, L. R., Richardson, S. E., Witkowska, M., and Zhang, S. X. (2010). Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4525–4533. doi: 10.1128/JCM.00883-10
- Petti, C. A., Bosshard, P. P., Brandt, M. E., Clarridge, J. E., Feldblyum, T. V., Foxall, P., et al. (2008). *Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing: Approved Guidelines*, Vol. 28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Piau, C., Kerjouan, M., Le Mouel, M., Patrat-Delon, S., Henaux, P. L., Brun, V., et al. (2015). First case of disseminated infection with *Nocardia cerraadoensis* in a human. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1034–1037. doi: 10.1128/JCM.02979-14
- Schlaberg, R., Fisher, M. A., and Hanson, K. E. (2013). Susceptibility profiles of *Nocardia* strains based on current taxonomy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 795–800. doi: 10.1128/JCM.02979-14
- Segawa, S., Nishimura, M., Sogawa, K., Tsuchida, S., Murata, S., Watanabe, M., et al. (2015). Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Proteomics* 12, 1–8. doi: 10.1186/s12014-015-9078-5
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., and Virdi, J. S. (2015). MALDI-TOF MS mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6:791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Thompson, J. D., Higgins, D. J., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673

- Vasileuskaya-Schulz, Z., Kaiser, S., Maier, T., Kostrzewa, M., and Jonas, D. (2011). Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF MS mass spectrometry. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 35–39. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.011
- Verroken, A., Janssens, M., Birhen, C., Bogaerts, P., Huang, T. D., Wauters, G., et al. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4015–4021. doi: 10.1128/JCM.01234-10
- Xiao, M., Lu Pang, S. C., Fan, X., Zhang, L., Li, H. X., Hou, X., et al. (2016). Accurate identification of common pathogenic *Nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 11:e0147487. doi: 10.1371/journal.pone.0147487

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer MQ-B and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2016 Carrasco, de Dios Caballero, Garrido, Valdezate, Cantón and Sáez-Nieto. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Shortcomings of the commercial MALDI-TOF MS database and use of MLSA as an arbiter in the identification of *Nocardia* species

Gema Carrasco, Juan de Dios Caballero, Noelia Garrido, Sylvia Valdezate*, Rafael Cantón, Juan A. Sáez-Nieto

* **Correspondence:** Sylvia Valdezate: svaldezate@isciii.es

Supplementary Table S1 | PCR primers and DNA amplification conditions for 16S rRNA partial and MLSA McTaggart *et al.* scheme.

Gene	Forward primer (5'-3') and position	Reverse primer (5'-3') and position	Amplification conditions	Reference
16S rRNA	Amplification: fD1 (11-30)* AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Amplification: rp2 (1431-1492)* CGGCTACCTTGTTACGACTT	1 min 94°C; 35x 30 s 90°C, 30 s 55°C, 30 s 72°C, 1 min 72°C;	Drancourt <i>et al.</i> , 2000
	Sequencing: E786F (761-778)* GATTAGATACCCTGGTAG	Sequencing: E1115R (1075-1090)* AGGGTTGCGCTCGTTG		Baker <i>et al.</i> , 2003
Multilocus Sequence Analysis (MLSA)				
16S rRNA	E8F (bp 11-30)* AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	534r (bp 493-509)* ATTACCGCGGCTGCTGG	30 s 98°C; 35x 5 s 98°C, 5 s 56°C, 20 s 72°C; 1 min 72°C	McTaggart <i>et al.</i> , 2010
<i>gyrB</i>	Noc- <i>gyrB</i> -F (bp 972-992)* CTTCGCCAACACCATCAACAC	Noc- <i>gyrB</i> -R (bp 1563-1582)* TGATGATCGACTGGACCTCG	30 s 98°C; 35x 5 s 98°C, 5 s 60°C, 20 s 72°C; 1 min 72°C	McTaggart <i>et al.</i> , 2010
	Noc- <i>gyrB</i> -F3 (bp 1011-1030)* CGAGGAGGGCTCCGCGCGG	Noc- <i>gyrB</i> -R3 (bp 1512-1532)* ATCGACTGGACCTCGTTGTTTC		
<i>hsp65</i>	Noc- <i>hsp65</i> -F (bp 145-164)* ACCAACGATGGTGTGCCAT	Noc- <i>hsp65</i> -R (bp 566-585)* CTTGTCGAACCGCATAACCCT	30 s 98°C; 35x 5 s 98°C, 5 s 54°C, 20 s 72°C; 1 min 72°C	McTaggart <i>et al.</i> , 2010
	Noc- <i>hsp65</i> -F2 (bp 109-129)* GTTGTCCTGGAGAAGAAGTGG	Noc- <i>hsp65</i> -R (bp 566-585)* CTTGTCGAACCGCATAACCCT		
<i>secA1</i>	<i>secA1</i> -F47 (bp 413-430)* GCGACGCCGAGTGGATGG	<i>secA1</i> -ConR2 (bp 876-896)* TTGGCCTTGATGGCGTTGTTC	30 s 98°C; 35x 5 s 98°C, 5 s 67°C, 20 s 72°C; 1 min 72°C	McTaggart <i>et al.</i> , 2010
	<i>secA1</i> -F47 (bp 413-430)* GCGACGCCGAGTGGATGG	<i>secA1</i> -ConR (bp 913-933)* GCGACGATGTAGTCCTTGTC		

*Positions are expressed respect to *N. farcinica* IFM 10152 (GenBank accession no. NR_074702)

References: Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., and Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3623–3630; Baker, G. C., Smith, J. J., and Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555. doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.009

Supplementary Table 2 | MLSA identification of isolates with discrepant 16S rRNA and MALDI-TOF MS identifications.

Isolate	16S rRNA identification (percentage similarity with respect to the reference strain)	MALDI-TOF MS identification (log score)	MLSA identification (percentage similarity to corresponding GenBank multilocus sequence)	Concordance between 16S rRNA and MLSA identification	Concordance between MALDI-TOF MS and MLSA identification
<i>IDENTIFIED AT GENUS LEVEL</i>					
HIGH PREVALENCE GROUP					
20061057	<i>N. cyriacigeorgica</i> (100%)	<i>N. abscessus</i> ² (2.104)	<i>N. kruczakiae</i> (98.1%)	No	No
20071090	<i>N. nova</i> (99.9%)	<i>N. aobensis</i> ¹ (1.595)	<i>N. aobensis</i> (98.9%)	No	Yes
20090138	<i>N. nova</i> (100%)	<i>N. otitidiscaviarum</i> ⁴ (1.971)	<i>N. puris/N. cerradoensis</i> (95.4%)	No	No
20090226	<i>N. nova</i> (100%)	<i>N. carnea</i> ¹ (1.299)	<i>N. testacea</i> (94.4%)	No	No
20100997	<i>N. nova</i> (99.4%)	<i>N. aobensis</i> ¹ (1.587)	<i>N. puris</i> (94.9%)	No	No
INTERMEDIATE PREVALENCE GROUP					
20071291	<i>N. brasiliensis</i> (100%)	<i>Nocardia</i> sp. MB9090 0JTHL ² (1.896)	<i>N. brasiliensis</i> (96.9%)	Yes	No
20081631	<i>N. carnea</i> (99.6%)	<i>N. farcinica</i> ¹ (1.389)	<i>N. puris</i> (97.0%)	No	No
20111159	<i>N. brasiliensis</i> (99.7%)	<i>Nocardia</i> sp. MB9090 0JTHL ¹ (2.200)	<i>N. brasiliensis</i> (97.4%)	Yes	No
20070999	<i>N. transvalensis</i> complex (99.8%)	<i>N. africana</i> ¹ (1.298)	<i>N. wallacei</i> (97.6%)	No	No
LOW PREVALENCE GROUP					
20060216	<i>Nocardia</i> sp. T42 (100%)*	<i>N. paucivorans</i> ¹ (1.756)	<i>N. paucivorans</i> (100%)	No	Yes
20070386	<i>Nocardia</i> sp. JCM 3016 (99.8%)*	<i>N. nova</i> ² (2.019)	<i>N. wallacei</i> (98.0%)	No	No
20070400	<i>N. exalbida</i> (99.9%)	<i>N. abscessus</i> ¹ (1.601)	<i>N. arthritis</i> (98.8%)	No	No
20071169	<i>N. vinacea</i> (99.8%)*	<i>N. aobensis</i> ¹ (1.913)	<i>N. asteroides</i> (96.9%)	No	No
20071587	<i>Nocardia</i> sp. 171747 (96.7%)*	<i>N. farcinica</i> ¹ (1.746)	<i>N. farcinica</i> (99.0%)	No	Yes
20071746	<i>Nocardia</i> sp. (98.1%)*	<i>N. concava</i> ² (1.376)	<i>N. concava</i> (99.3%)	No	Yes
20080233	<i>N. wallacei</i> (99.8%)*	<i>N. sienata</i> ¹ (1.550)	<i>N. sienata</i> (97.0%)	No	Yes
20090880	<i>N. neocaledoniensis</i> (98.6%)	<i>N. asteroides</i> ⁴ (1.309)	<i>N. asteroides</i> (98.0%)	No	Yes
20091616	<i>N. rhamnosiphila</i> (100%)*	<i>N. testacea</i> ¹ (1.501)	<i>N. rhamnosiphila</i> (100%)	Yes	No
20091663	<i>N. testacea</i> (99.8%)	<i>N. sienata</i> ¹ (1.652)	<i>N. sienata</i> (99.1%)	No	Yes
20091803	<i>N. cerradoensis</i> (99.7%)	<i>N. nova</i> ² (1.484)	<i>N. cerradoensis</i> (99.2%)	Yes	No
20091823	<i>N. pneumoniae</i> (99.3%)	<i>N. farcinica</i> ³ (1.724)	<i>N. pneumoniae</i> (97.7%)	Yes	No
20091843	<i>N. rhamnosiphila</i> (99.9%)*	<i>N. sienata</i> ¹ (1.498)	<i>N. testacea</i> (97.4%)	No	No
20091844	<i>Nocardia</i> sp. FSN35 (99.6%)*	<i>N. testacea</i> ¹ (1.522)	<i>N. sienata</i> (97.0%)	No	No

Supplementary Material

20100053	<i>N. jiangxiensis</i> (100%)*	<i>N. elegans</i> ² (1.357)	<i>N. puris</i> (94.7%)	No	No
20100128	<i>N. grenatensis</i> (99.6%)*	<i>Nocardia</i> sp. ³ (1.366)	<i>N. rhamnosiphila</i> (98.7%)	No	No
20101005	<i>N. wallacei</i> (99.8%)*	<i>N. testacea</i> ¹ (1.623)	<i>N. rhamnosiphila</i> (99.8%)	No	No
20101525	<i>N. cerradoensis</i> (99.5%)	<i>N. aobensis</i> ¹ (1.372)	<i>N. aobensis</i> (95.1%)	No	Yes
20120097	<i>N. shimofusensis</i> (99.8%)*	<i>Nocardia</i> sp. ² (1.381)	<i>N. higoensis</i> (95.7%)	No	No
20120308	<i>N. pneumoniae</i> (99.2%)	<i>N. aobensis</i> ¹ (1.647)	<i>N. pneumoniae</i> (96.5%)	Yes	No
20120772	<i>N. ignorata</i> (99.6%)	<i>N. asteroides</i> ¹ (1.382)	<i>N. pneumoniae</i> (94.4%)	No	No
20130579	<i>Nocardia</i> sp. FSN35 (99.7%)*	<i>N. sienata</i> ¹ (1.399)	<i>N. testacea</i> (97.5%)	No	No
20130718	<i>Nocardia</i> sp. 84317 (99.5%)*	<i>N. asiatica</i> ¹ (1.526)	<i>N. puris</i> (94.9%)	No	No
20130720	<i>Nocardia</i> sp. FSN35 (100%)*	<i>N. testacea</i> ¹ (1.527)	<i>N. testacea</i> (97.4%)	No	Yes
20130759	<i>N. cerradoensis</i> (99.8%)	<i>N. nova</i> ² (1.725)	<i>N. cerradoensis</i> (99.2%)	Yes	No

MISSIDENTIFIED AT BOTH SPECIES AND GENUS LEVEL

HIGH PREVALENCE GROUP					
20080801	<i>N. farcinica</i> (99.9%)	<i>Staphylococcus capitis</i> ssp. <i>urealyticus</i> ² (1.407)	<i>N. farcinica</i> (99.8%)	Yes	No
INTERMEDIATE PREVALENCE GROUP					
20060952	<i>N. carnea</i> (99.9%)	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ¹ (1.287)	<i>N. carnea</i> (95.7%)	Yes	No
20070252	<i>N. transvalensis</i> complex (99.7%)	<i>Weissella viridescens</i> ¹ (1,730)	<i>N. wallacei</i> (98.2%)	No	No
20070519	<i>N. transvalensis</i> complex (99.7%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ¹ (1,286)	<i>N. wallacei</i> (98.3%)	No	No
20080303	<i>N. carnea</i> (99.6%)	<i>Lactobacillus fructivorans</i> ¹ (1.271)	<i>N. wallacei</i> (96.4%)	No	No
20100800	<i>N. carnea</i> (99.8%)	<i>Lactobacillus paralimentarius</i> ³ (1.428)	<i>N. carnea</i> (95.0%)	Yes	No
20101207	<i>N. carnea</i> (99.6%)	<i>Agromyces rhizospore</i> ¹ (1.360)	<i>N. puris</i> (97.2%)	No	No
20110040	<i>N. carnea</i> (99.7%)	<i>Lactobacillus fructivorans</i> ¹ (1.453)	<i>N. carnea</i> (95.6%)	Yes	No
LOW PREVALENCE GROUP					
20060048	<i>N. beijingensis</i> (99.8%)*	<i>Lactobacillus brevis</i> ¹ (1.262)	<i>N. pneumoniae</i> (96.5%)	No	No
20060423	<i>N. ignorata</i> (99.9%)	<i>Legionella dumoffii</i> ¹ (1.262)	<i>N. asteroides</i> (94.2%)	No	No
20060742	<i>N. beijingensis</i> (99.7%)*	<i>Candida auris</i> ³ (1.314)	<i>N. pneumoniae</i> (96.5%)	No	No
20060907	<i>N. wallacei</i> (99.7%)*	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ¹ (1.368)	<i>N. wallacei</i> (98.2%)	Yes	No
20070689	<i>N. ignorata</i> (99.6%)	<i>Lactobacillus amylovorus</i> ⁴ (1.189)	<i>N. ignorata</i> (98.9%)	Yes	No
20080144	<i>N. takedensis</i> (100%)*	<i>Candida krusei</i> ¹ (1.227)	<i>N. ignorata</i> (98.1%)	No	No
20080320	<i>Nocardia</i> sp. PK2002 (99.8%)*	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> ¹ (1.504)	<i>N. pneumoniae</i> (97.4%)	No	No
20080566	<i>N. beijingensis</i> (100%)	<i>Candida krusei</i> ¹ (1.421)	<i>N. beijingensis</i> (99.1%)	Yes	No
20080687	<i>N. asteroides</i> (99.3%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹ (1.410)	<i>N. puris</i> (95.1%)	No	No
20080895	<i>N. flavorosea</i> (99.3%)*	<i>Kocuria</i> sp. ¹ (1.392)	<i>N. flavorosea</i> (95.6%)	Yes	No
20080920	<i>N. paucivorans</i> (99.8%)	<i>Arthrobacter ruscicus</i> ¹ (1.100)	<i>N. paucivorans</i> (95.7%)	Yes	No

20081082	<i>N. takedensis</i> (99.8%)*	<i>Candida druse</i> ¹ (1.277)	<i>N. cyriacigeorgica</i> (97.4%)	No	No
20081312	<i>N. ignorata</i> (99.6%)	<i>Trichosporon mucoides</i> ¹ (1.304)	<i>N. ignorata</i> (98.4%)	Yes	No
20081439	<i>N. puris</i> (99.7%)*	<i>Clostridium septicum</i> ⁵ (1.376)	<i>N. puris</i> (99.2%)	Yes	No
20081632	<i>N. ignorata</i> (99.6%)	<i>Salmonella</i> sp. ¹ (1.240)	<i>N. ignorata</i> (98.9%)	Yes	No
20090011	<i>N. asteroides</i> (99.9%)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ¹ (1,989)	<i>N. asteroides</i> (96.6%)	Yes	No
20090451	<i>Nocardia</i> sp. PK2002 (99.7%)	<i>Acidovorax temeprans</i> ¹ (1.343)	<i>N. puris</i> (92.3%)	No	No
20090803	<i>N. beijingensis</i> (100%)*	<i>Trichospora mucoides</i> ¹ (1.460)	<i>N. araoensis</i> (97.3%)	No	No
20090922	<i>Nocardia</i> sp. PK2002 (99.0%)	<i>Lactobacillus brevis</i> ⁴ (1.459)	<i>N. araoensis</i> (96.3%)	No	No
20091802	<i>Nocardia</i> sp. T42 (99.8%)	<i>Lactobacillus fructivorans</i> ¹ (1.367)	<i>N. carnea</i> (95.3%)	No	No
20100098	<i>N. beijingensis</i> (100%)*	<i>Lactobacillus fructivorans</i> ¹ (1.228)	<i>N. arthritis</i> (97.3%)	No	No
20111234	<i>N. niigatensis</i> (99.9%)*	<i>Streptomyces griseus</i> ¹ (1.285)	<i>N. niigatensis</i> (96.4%)	Yes	No
20120055	<i>N. veterana</i> (99.7%)	<i>Streptococcus mutans</i> ¹ (1.443)	<i>N. veterana</i> (99.4%)	Yes	No
20130578	<i>N. elegans</i> (99.7%)	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i> ³ (1.118)	<i>N. veterana</i> (99.2%)	No	No
20130836	<i>N. ignorata</i> (99.2%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ¹ (1.383)	<i>N. ignorata</i> (98.6%)	Yes	No

*: Species not present in the MALDI-TOF MS Bruker commercial database at the time of study

¹: Protein extraction via the Verroken *et al.* method

²: Protein extraction via the Verroken *et al.* method after mechanical disruption with glass beads

³: Protein extraction via the Verroken *et al.* method after freezing for 48 h

⁴: Protein extraction via the Verroken *et al.* method with 10 min of prior sonication

Supplementary file 1 | Protein extraction methods employed before the MALDI-TOF MS analysis.

Protein extraction method 1: Based in the Verroken *et al* protocol: *Nocardia* strains were incubated on buffered charcoal yeast extract agar (BCYE) or Columbia 5% sheep blood agar at 37°C for at least 48 h. Almost 10 colonies were scraped from the agar and added to 500 µl distilled water. They were mixed and boiled for 30 min, followed by a centrifugation at 13,000 rpm for 2 min. The supernatant was removed, and the pellet was suspended in 300 µl distilled water. Then, 900 µl of ethanol were added. Two series of centrifugation for 2 min at 13,000 rpm and complete supernatant removal lead to the dried pellet. This pellet was suspended in 50 µl of formic acid (70%) and later incubated for 15 min at room temperature. Afterward, 50 µl of acetonitrile was gently added and the mixture was centrifuged for 2 min at 13,000 rpm. The supernatant was employed for the MALDI-TOF MS analysis.

Protein extraction method 2: The colonies suspended in distilled water were fractured by mechanical disruption with glass-beads before 30 minutes boiling. Afterward, the rest of the Verroken *et al* method was developed.

Protein extraction method 3: The colonies suspended in distilled water undergone 10 min of sonication at 2500 oscillation during 1 min using a Mini Bead Beater (Biospec Products, Bartlesville, OK). After, the 30 minutes of the boiling step and the remaining Verroken *et al* method was developed.

Protein extraction method 4: After boiling for 30 minutes the suspended colonies, they were frozen for 24 h before proceeding to protein extraction. Then, the Verroken *et al* protocol was carried on from the removal of the supernatant.

Reference: Verroken, A., Janssens, M., Birhen, C., Bogaerts, P., Huang, T.D., Wauters, et al. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.* 48: 4015–4021. doi: 10.1128/JCM.01234-10

[SEARCH/BROWSE](#) ▾[JOURNALS/MAGAZINES](#) ▾[BOOKS](#)[REPORTS/GUIDELINES](#) ▾[WEBINARS](#)[Home](#) /

GENOME ANNOUNCEMENTS- AUTHOR WARRANTY

AUTHOR WARRANTY AND PROVISIONAL LICENSE TO PUBLISH

ACCOUNT LOGIN

Retention of Rights

Ownership of copyright in the Work remains with the Author. The Author and ASM agree that in addition to any rights under copyright retained by the Author, the Author retains (i) the rights to reproduce, to distribute, to publicly perform, and to publicly display the Work in any medium; (ii) the right to prepare derivative works from the Work; and (iii) the right to authorize others to make any use of the Work provided proper credit is given to the original Genome Announcements publication. For example, the Author may make and distribute copies in the course of teaching and research and may post the Work on personal or institutional Web sites and in other open-access digital repositories.

All rights, title and interest in Genome Announcements as a collective work shall remain with ASM. Nothing in this Agreement shall give the Author any proprietary rights in Genome Announcements other than in the Work.



First Draft Genome Sequence of a Clinical Strain of *Nocardia cerradoensis*

Gema Carrasco,^a Sara Monzón,^b Pilar Jiménez,^c Isabel Cuesta,^b Joaquín Bartolomé-Alvarez,^d  Sylvia Valdezate^a

Reference and Research Laboratory for Taxonomy, Department of Bacteriology, National Centre of Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^a; Laboratory of Bioinformatics, Common Scientific Technical Units, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^b; Genomics Laboratory, S. G. for Applied Services, Training and Research, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^c; Microbiology Department, University Hospital of Albacete, Albacete, Spain^d

ABSTRACT This paper reports the first draft genome sequence for a strain of *Nocardia cerradoensis* obtained from an immunocompetent patient with a knee infection. The 8.2-Mb genome has 8,329 coding sequences, including intrinsic resistance genes, biosynthetic gene clusters for polyketide synthase and nonribosomal peptide synthase, virulence genes, and prophages.

Nocardia species are environmental bacteria that cause severe opportunistic infections of the lung, skin, and central nervous system, although mainly in immunocompromised patients. Of 110 recognized species of this genus (<http://www.bacterio.net/>), more than half are described as human pathogens. *Nocardia cerradoensis* was initially described in Brazilian soil (1); as a pathogen it was first noticed causing disseminated infection in a patient who had received a kidney graft (2). Although *N. cerradoensis* has been proposed as an emerging global pathogen (3), no genome of an *N. cerradoensis* clinical strain has previously been sequenced. Here, we describe the draft genome sequence of *N. cerradoensis* CNM20130759, isolated from a postinfiltration cutaneous infection on the knee of a 52-year-old immunocompetent woman (4). The antimicrobial profile of this isolate fitted that described for the *Nocardia nova* complex pattern (5). The 16S rRNA and *gyrB* genes, and the multilocus sequence type (6), were most similar to those of *N. cerradoensis* W9747^T (99.9%, 99.5%, and 99.6% similarities, respectively).

A paired-end library (Nextera-XT DNA library preparation kit, Illumina 1.9) was adapted and sequenced at 2 × 150 in the Illumina NextSeq 500 platform. After quality control analysis using fastQC v.0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and Trimmomatic v.0.36 software (7), ~4.9 million paired-end reads of 50 to 151 bp were retrieved. Assembly of the reads was performed using SPAdes v.3.8.0 (8), and the quality of the assembly was evaluated using QUAST software (9).

The genome was found to be 8,193,765-bp long, with a G+C content of 68.16% (150 contigs of ≥500 bp; maximum, 1,035,523 bp; *N*₅₀ value, 394,043 bp). The assembled sequences were annotated using Prokka 1.12-beta software (10), which predicted 8,406 genes (8,329 protein-coding sequences, 5 rRNA genes, 1 transfer-messenger RNA [tmRNA] gene, and 71 tRNA genes) and 543 signal peptides. Among the protein-coding genes, 2,060 were unique and 704 repeated 2 to 41 times. Multiple antibiotic resistance and efflux pump genes [*acc(6')*-I, *blal*, *rrrA*, *rrrB*, *rrrC*, *emrY*, *inhA*, *mdtG*, *mdtK*, *mdtH*, *mdtL*, *mmr*, NCRCNM_01156, NCRCNM_01157, NCRCNM_01690, NCRCNM_01779, NCR CNM_06233, NCRCNM_06526, *norM*, *stp*, *tetR*, and *yfmO*, among others], antiseptic genes (*sugE* and *qacA*), metalloproteinase genes (*tldD*, *yflN*, *ycnJ*, and *merR*), and integrase genes (Int-Tn 1 to 3) were detected, but no clustered regularly interspaced

Received 28 April 2017 Accepted 11 August 2017 Published 28 September 2017

Citation Carrasco G, Monzón S, Jiménez P, Cuesta I, Bartolomé-Alvarez J, Valdezate S. 2017. First draft genome sequence of a clinical strain of *Nocardia cerradoensis*. *Genome Announc* 5:e00551-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00551-17>.

Copyright © 2017 Carrasco et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Sylvia Valdezate, svaldezate@isciii.es.

short palindromic repeats (CRISPR) were found. One intact prophage (with *attL/attR* sites) and five incomplete prophages were identified by PHAST software (11), representing 0.84% of the genome. Neither SRST2 (12) nor ARGannot (13) software detected any plasmid or acquired resistance genes.

Virulence genes for *mce2* (mammalian cell invasion), hemolysin, superoxide dismutase, catalase-peroxidase, cutinase, esterases, hemagglutinin, the antigen 85 complex family, ESX-1, and sortase A (among others) were all detected; some of these have been previously described for *Nocardia farcinica* (14). Biosynthetic gene clusters such as 12 nonribosomal peptide synthases (NRPS), 8 polyketide synthases (PKS-I-III), 4 terpene cyclases, 6 NRPS, and 2 unique PKS-I genes were found using antiSMASH software (15).

This clinical strain showed 99.4% similarity, by ANI software (16), to the *N. cerra-doensis* W9747^T draft genome (a soil bacterium), which has a length of 7.6 Mbp, a G+C content of 68.16%, 7,216 protein-coding genes (8 rRNAs), and 1 CRISPR. Increased understanding of the differences between the human and environmental strains expands our knowledge of *N. cerra-doensis*.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number [NGAF00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NGAF00000000). The version described in this paper is version [NGAF01000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NGAF01000000).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to N. Garrido, J. A. Saéz-Nieto, M. D. Pérez-Vázquez, and A. Zaballos for their help in the different stages of the genome sequencing and to Adrian Burton for language and editing assistance.

This work was funded by project MPY1278/15 of the Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

- Albuquerque de Barros EV, Manfio GP, Ribiero Maitan V, Mendes Bataus LA, Kim SB, Maldonado LA, Goodfellow M. 2003. *Nocardia cerra-doensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:29–33. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02020-0>.
- Piau C, Kerjouan M, Le Mouel M, Patrat-Delon S, Henaux PL, Brun V, Morin MP, Gautier P, Rodriguez-Nava V, Kayal S. 2015. First case of disseminated infection with *Nocardia cerra-doensis* in a human. *J Clin Microbiol* 53:1034–1037. <https://doi.org/10.1128/JCM.02979-14>.
- Ercibengoa M, Pérez-Trallero E, Marimón JM. 2016. Autochthonous *Nocardia cerra-doensis* infection in humans, Spain, 2011 and 2014. *Emerg Infect Dis* 22:109–111. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150771>.
- Escudero-Jiménez Á, Saéz-Nieto JA, Turowicz M, Bartolomé-Álvarez J. 2016. Infección cutánea por *Nocardia cerra-doensis* tras infiltración. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34:325–326. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.07.015>.
- CLSI. 2011. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic actinomycetes, 2nd ed, vol 31, no. 5. Approved standard M24-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. 2010. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol* 48:4525–4533. <https://doi.org/10.1128/JCM.00883-10>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39:W347–W352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>.
- Inouye M, Dashnow H, Raven LA, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, Zolber J, Holt KE. 2014. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med* 6:90. <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-014-0090-6>.
- Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, Rolain JM. 2014. ARG-Annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 58:212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>.
- Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, Shiba T, Hattori M. 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14925–14930. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406410101>.
- Blin K, Medema MH, Kottmann R, Lee SY, Weber T. 2017. The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 45:D555–D559. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw960>.
- Zhang W, Du P, Zheng H, Yu W, Wan L, Chen C. 2014. Whole-genome sequence comparison as a method for improving bacterial species definition. *J Gen Appl Microbiol* 60:75–78. <https://doi.org/10.2323/jgam.60.75>.

ARTÍCULO 5

Primer proyecto de la secuencia del genoma completo de una cepa clínica de *Nocardia cerradoensis*

““First Draft Genome Sequence of a Clinical Strain of *Nocardia cerradoensis*”

Carrasco, G., Monzón, S., Jiménez, P., Cuesta, I., Bartolomé-Alvarez, J., & Valdezate, S. (2017).

Genome announcements, 5(39), e00551-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00551-17>

Epub 2017 Sep 28.

PMID: 28963198

Factor de Impacto 2017: 0.99

Cuartil: Q3

Número de citas: 0

Table S1. Comparison of the main typing characteristics (16S rDNA, *gyrB*, and GyrB) between the *N. cyriacigeorgica* soil strains from Lara State (Venezuela) and clinical samples from Spanish patients.

Target Source (no. of strains)	16S rRNA (514bp*)		<i>gyrB</i> (726bp*)		GyrB (242aa†)	
	Soil samples (n=29)	Clinical samples (n=30)	Soil samples (n=29)	Clinical samples (n=30)	Soil samples (n=29)	Clinical samples (n=30)
Haplotypes number	3	1	13	17	12	9
HGDI‡	0.537	0	0.761	0.940	0.726	0.786
SNPs number [¶] (divergence rate)	2 (0-1)	0	212 (0.0-16.4)	77 (0.0-5.6)	121 (0.0-1.8)	12 (0.0-0.4)
SNP range per strain [¶] (average, mode)	0-1 (0.1, 0)	0	1-109 (43, 50)	0-38 (28, 36/38)	2-72 (30, 37)	0-10 (6, 7)

*Analyzed sequence size in numbers of base pairs; †Analyzed sequence size in numbers of amino acids; ‡HGDI correspond to the Hunter and Gaston discrimination index; ¶With respect to *N. cyriacigeorgica* DSM 44484 (GenBank accession number NR_041857 for 16S rRNA, and JN041323 for *gyrB* and GyrB).

Table S2. Interpretations of the analysis of the genomes of the soil *N. cyriaciorgica* strains and the NCBI-available *N. cyriaciorgica* genomes in terms of *gyrB*, ANI, AAI, *in silico* genome-to-genome distance similarity (GGDH; DDH-estimate), and differences in G+C content.

Strain (ID no./refSeq)	<i>gyrB</i> (≥93.5%) ^{1,2}		TrueBac™ ANI ³	AAI profiler ⁴ (average identity)	Type (Strain) Genome Server ⁵ estimate, difference of <1% G+C) ^{1,2} and interpretation	≥70% DDH- estimate and interpretation
	GUH-2	DSM 44484 ^T	GUH-2	GUH-2	GUH-2	NBRC 100375 (alternative designation DSM 44484 ^T)
GUH-2 (NC_016887)	--	94.77	Not determined ⁶	--	--	0.17
DSM 44484 ^T	94.77	--	Not determined ⁶	0.93	0.15	Potential new species
(NZ_VBUR000000000)			90.26			0.03
20110624 (JAAGVC000000000)	95.32	95.98	<i>Nocardia</i> sp. nov. genomic evidence	0.80	0.05	65.9 - 73.5, 0.13
20110626 (JAAGVB000000000)	99.45	95.34	98.34 <i>Nocardia</i> sp. nov.	0.85	0.11	61.2 - 68.6, 0.06
			87.76			Potential new species
20110629 (JAAGVA000000000)	93.12	92.37	<i>Nocardia</i> sp. nov. <i>cyriaciorgica</i> GUH-2 (FO082843)	0.76	1.75	44.8 - 51.7, 1.58
			87.78			Potential new species
20110639 (JAAGUZ000000000)	93.12	92.6	<i>Nocardia</i> sp. nov.	0.76	1.43	45.2 - 52.1, 1.26
20110648 (JAAGUY000000000)	92.85	92.85	87.78 <i>Nocardia</i> sp. nov.	0.75	1.42	45.0 - 51.9, 1.25
20110649 (JAAGUX000000000)	92.16	91.20	Not determined ⁶	0.75	1.46	Potential new species
3012STDY6756504 (NZ_LR215973)	96.84	97.93	Not determined ⁶	0.82	0.13	44.7 - 51.5, 1.28
EML 446 (NZ_VBUT000000000)	97.08	97.03	Not determined ⁶	0.80	0.14	Potential new species
EML 1456 (NZ_VBUU000000000)	96.94	96.95	Not determined ⁶	0.75	0.34	80.9 - 87.8, 0.04
						Potential new species
MDA3349 (NZ_CP026746)	96.55	99.84	Not determined ⁶	0.82		66.0 - 73.5, 0.03
						Potential new species
MDA3732 (NZ_PSZF000000000)	94.32	96.97	Not determined ⁶	0.82		61.1 - 68.5, 0.17
						Potential new species
						85.4 - 91.5, 0.09
						Belongs to <i>Nocardia cyriaciorgica</i>
						83.9 - 90.3, 0.03
						Belongs to <i>Nocardia cyriaciorgica</i>

¹The reference breakpoints (for *gyrB*, ANI, AAI, and DDH-estimate and differences in G+C content) for assigning membership to a specific species are indicated in brackets. ²Values lower than the reference breakpoints, suggestive of a distinct species, are indicated in italics. ³Average nucleotide identity (ANI) determined using the TrueBac™ system (<https://www.truebacid.com/genome/>). ⁴Average amino acid identity (AAI) determined by the AAI-profiler system

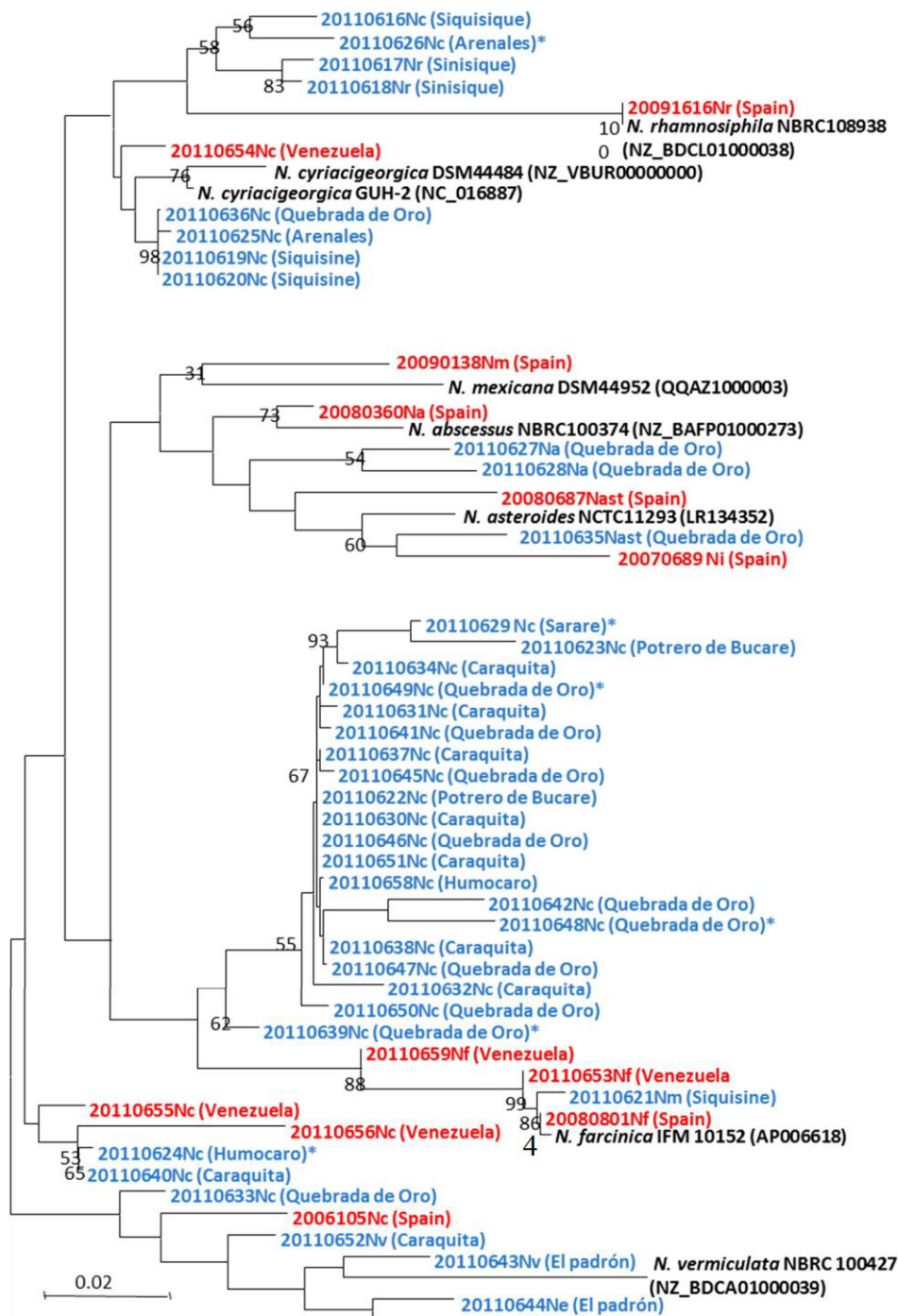


Figure S1. Phylogenetic ML tree based on the MLSA analysis (*gyrB*-16S rRNA-*secA*-*hsp65* genes) of the 38 *N. cyriacigeorgica* strains from soil (in blue), 5 *Nocardia* clinical strains from Venezuelan patients and nine Spanish clinical strains representing each species present in soil (in red), plus the type strains (in black). The asterisk indicates the strains selected for WGS. Na stands for *N. abscessus*, so on Nast for *N. asteroides*, Nc for *N. cyriacigeorgica*, Ne for *N. elegans*, Nf for *N. farcinica*, Ni for *N. ignorata*, Nm for *N. mexicana*, Nn for *N. nova*, Nr for *N. rhamnosiphila*, and Nv for *N. vermiculata*. The reliability of the topologies was assessed by the bootstrap method with 1000 replicates.

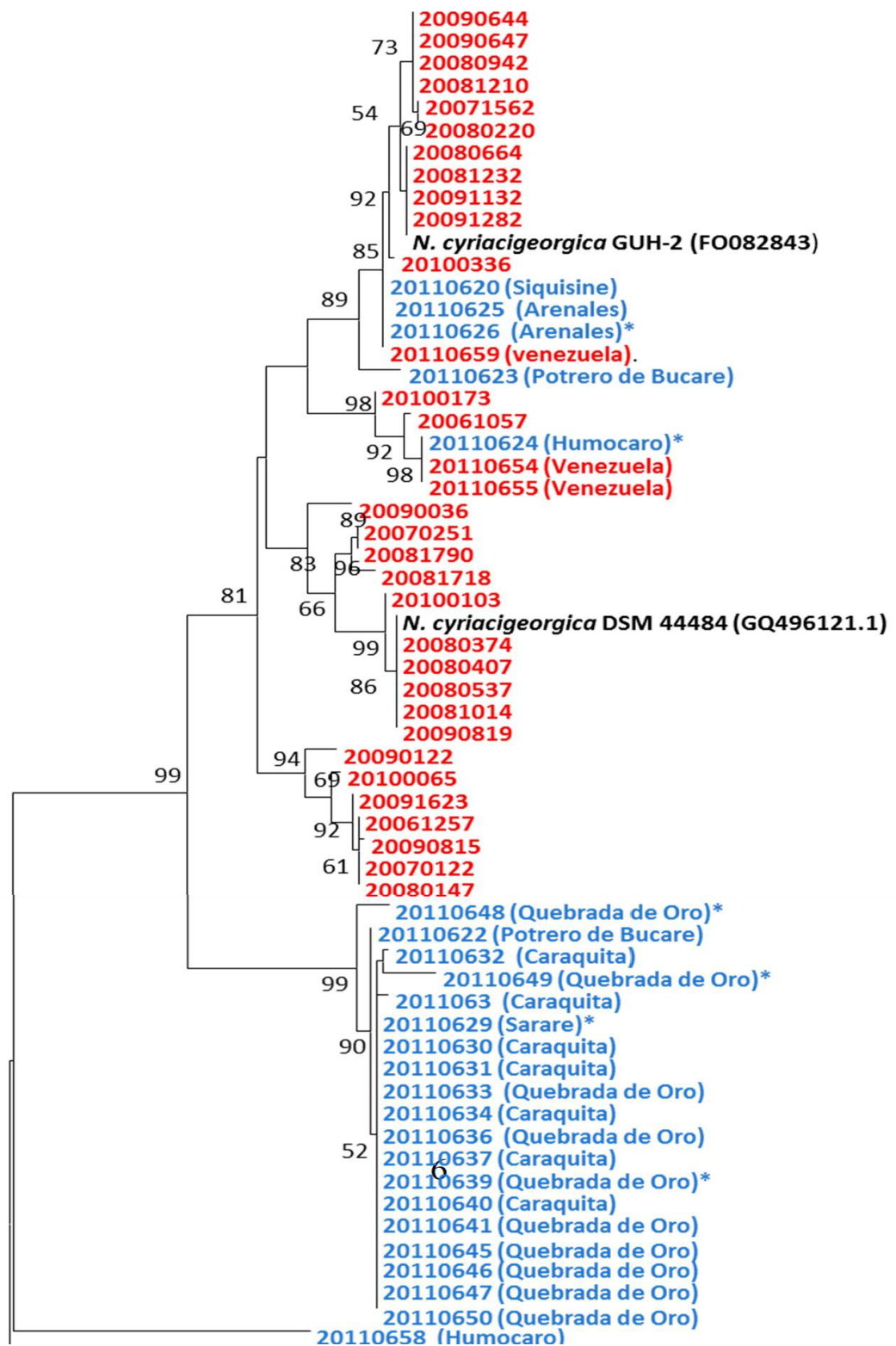


Figure S2. Phylogenetic relationships of the 29 Venezuelan *N. cyriacigeorgica* soil strains (in blue), three Venezuelan and 30 Spanish *N. cyriacigeorgica* clinical strains (in red), as revealed by their *gyrB* genes. The reliability of the ML topologies was assessed by the bootstrap method (1000 replications). The asterisk indicates the strains selected for WGS.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

GUH-2 MTE^TTL^PPP^NGG^AGD^RIE^PVD^IQ^NEM^QSS^YID^YAM^SVIV^GRAL^PDV^RDGL^KPV^HRR^VLY^AMY^DNG^YR^PDR^GY^VKS^AR^PV^AET^MGN^YHP^HGD^ASI^YD^TLV^RM

DSM44484

20110626

20110624

20110629S.....

20110639S.....

20110648S.....

20110649S.....

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

GUH-2 AQP^WSL^RY^PLV^DG^QGN^FGS^RGN^DGAA^AM^RY^TEC^RLT^PLAME^LLL^REID^HET^VDF^TPN^YD^GRS^QEP^VVL^PSR^VPN^LLM^NGS^NGI^AV^GMA^TNI^PPH^NL^NE^LAE

DSM44484

20110626

20110624D.....

20110629M.....V.....T.....A.....

20110639M.....V.....T.....A.....

20110648M.....V.....T.....A.....

20110649M.....V.....T.....A.....

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

GUH-2 AI^YWAL^ENY^DAD^EEAT^LAAC^MER^VK^GPD^FPTAG^LIV^GG^QGI^HDAY^TTGR^SIR^MRG^VVE^IEED^TR^GRT^TIV^ITEL^PY^QV^NTD^NF^INS^IAE^QV^KD^GKI^AGI

DSM44484

20110626

20110624

20110629D.E...S.....S.....

20110639D.E...S.....S.....

20110648D.E...S.....S.....

20110649D.E...S.....S.....

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

GUH-2 SD^IH^DESS^DRAG^MRIV^VTV^KRDA^VAK^VV^LNN^LY^KHT^QL^QTS^FGAN^LSIV^DGV^PRTL^RLD^QMIR^YY^VEH^QLE^VIV^RRR^TRY^LLR^KA^EER^AH^ILR^GL^VKAL^D

DSM44484

20110626

```

20110624 .....
20110629 .....F.....
20110639 .....F.....
20110648 .....F.....
20110649 .....F.....
410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GUH-2    ALDEVIALIRRSANTDTARTGLMQLLDIDEIQATAILDMQLRRLSALERQKIIDELAKIEAEIADLKDILDKPERQRAIVRDELAEIVEKEYGDERRTKII
DSM44484 .....V.....G.....
20110626 .....
20110624 .....V.....
20110629 .....D.E.....V.....E.....
20110639 .....D.E.....V.....E.....
20110648 .....D.E.....V.....E.....
20110649 .....D.E.....V.....E.....
510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GUH-2    AADGDVADEDLIAREDVVVITITETGYAKRTKTDLYRSQKRGGKGVQAGLQDDLVKHFITSTHDLWLLFFTNKGRVYRAKAYELPEANRTARGQHVANL
DSM44484 .....
20110626 .....
20110624 .....
20110629 .....S.....S.....
20110639 .....S.....S.....
20110648 .....S.....S.....
20110649 .....S.....S.....
610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GUH-2    LAFQPD EKIAQIIRIKSYEDAPYLVLATKNGLVKSRLSDFDSNRSGGIVAVNLRDNDELVGAVLCSADDDLLVSAQQQSIRFAATDEALRPMGRATSG
DSM44484 .....
20110626 .....
20110624 .....
20110629 .....S.....
20110639 .....S.....
20110648 .....S.....
20110649 .....S.....

```

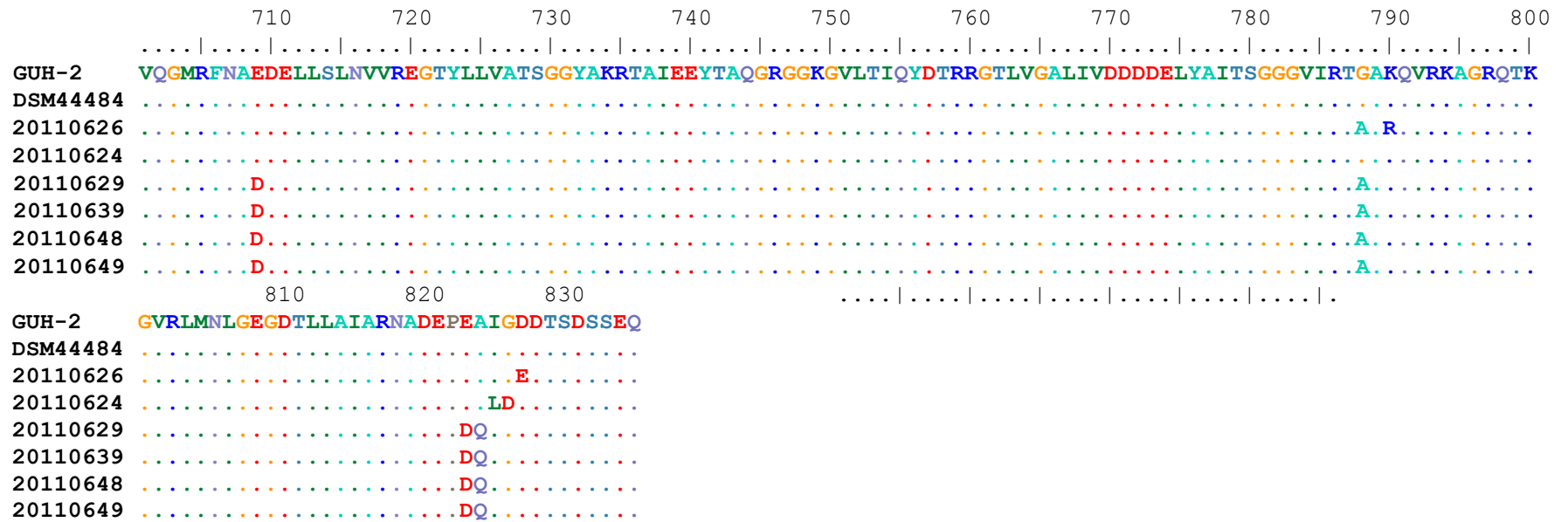


Figure S3. Amino acid sequences of GyrA alignment from *N. cyriaci georgica* genome reference strain GUH-2, type strain DSM44484^T, CNM20110626, and CNM20110624 with major allele GyrA1, and the strains of the soil-only cluster (CNM20110629, CNM20110639, CNM20110648, and CNM20110649) with major allele GyrA2.

Material and methods. Soil *Nocardia* spp. culture and presumptive identification

The collection, culture, and presumptive identification were carried out by microbiologists of the Microbiology and Parasitology Department of the Faculty of Pharmacy and Bioanalysis (Los Andes University, Mérida-Venezuela).

This appendix includes the method previously published in Spanish by Ramírez A, Blanco M and García E in 2003 titled "Biogeografía de *Nocardia*: Estudio de la población edáfica de *Nocardia* en diversas zonas climáticas del Estado de Lara". *Rev Soc Ven Microbiol.* 23:1-7

Soil samples each weighing ≈ 300 g were collected randomly from a depth of 10 cm, after removing the surface. The samples were transferred aseptically to sterile bags and maintained at 4°C after recollection. The loam and the sandy-clay loam were sifted through (2mm/10 mesh), handily homogenized for 15 minutes and dried at 105° C for 3 days. Each 50g of this sample was added to 450ml of charcoal-free broth [1] and gently shaken for 20 minutes. Later, the sediment of 10 minutes conforming to the 10^{-1} dilution was serially diluted to 10^{-8} [2].

From each 10^{-8} dilution, five aliquots of (1 ml each tube) were incubated at 34 °C for five weeks including a paraffin dipstick and nine milliliters of CFB. As previously is described, the paraffin batting technique is based on the ability of the *Nocardia* genus to use paraffin as an only Carbon source [3]. The emergent colonies were grown in nutrient agar and identified as *Nocardia* genus by: phenotypic analysis of macro- and microscopic characteristics, Gram stain and degree of fragmentation of the hyphae (microculture), lysozyme resistance, presence of methyl esters of mycolic acids by thin-layer chromatography on silica gel [4]; and by the analysis of hydrolysis or decomposition of casein, xanthine, hypoxanthine, tyrosine and urea [5].

References

1. McClung N. Isolation of *Nocardia asteroides* from soils. *Mycology.* **1960.** 52: 154-156.
2. Ramirez, A.; Blanco, M.; Garcia, E. Biogeografía de *Nocardia*: Estudio de la población edáfica de *Nocardia* en diversas zonas climáticas del estado Lara, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* **2003.**23:142-147
3. Shawar, R.M; Moore, D.G.; LaRocco, M.T. Cultivation of *Nocardia* spp. on chemically defined media for selective recovery of isolates from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **1990.** 28:508-512.
4. Hamid, M.E.; Minnikin, D.E.; Goodfellow, M.A. Simple chemical test to distinguish mycobacteria from other mycolic-acid-containing actinomycetes. *J Gen Microbiol.* **1993.** 139:2203-2213.
5. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia.* **2006**

ARTÍCULO 6

Caracterización molecular y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Nocardia* aisladas en suelo; una comparativa con cepas aisladas de humanos

“Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibilities of *Nocardia* Species Isolated from the Soil; A Comparison with Species Isolated from Humans”

Carrasco, G., Monzón, S., San Segundo, M., García, E., Garrido, N., Medina-Pascual, M. J., Villalón, P., Ramírez, A., Jiménez, P., Cuesta, I., & Valdezate, S. (2020). *Microorganisms*, 8(6), E900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060900>

Epub 2020 Jun 15

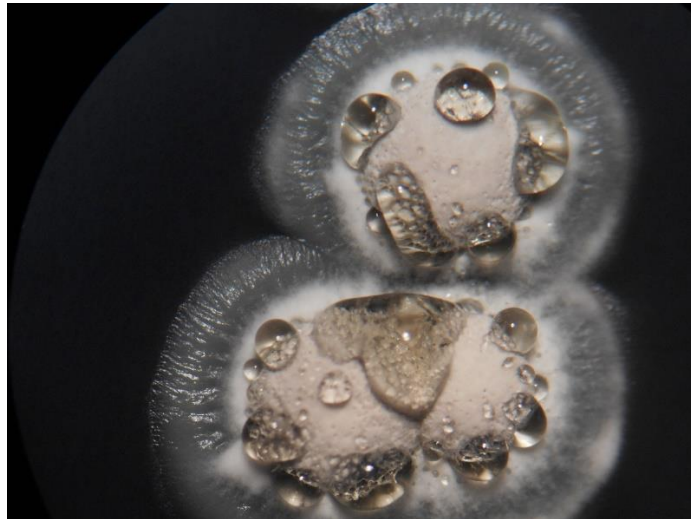
PMID: 32549367

Factor de Impacto 2020: 4.167

Cuartil: Q2

Número de citas: 1

DISCUSIÓN



La clasificación taxonómica del género *Nocardia* constituye uno de los grandes retos de la microbiología médica desde hace años [Murray, 2009]. Ya en los primeros trabajos que exploraban las características de este género, como “The Type Species of the Genus *Nocardia*” [Gordon, 1960] y “Numerical Taxonomy of the Genus *Nocardia*” [Txukamura, 1969], se describen las dificultades para esclarecer la identificación de las especies que lo componen. Tradicionalmente, estos microorganismos se han clasificado basándose en las características de crecimiento, en el patrón de resistencia a antimicrobianos y en las pruebas bioquímicas, lo que ha resultado superado en la era de la genética por la implantación de la identificación de especies mediante la secuenciación de genes conservados que se encuentran presentes en todas las especies. En microbiología clínica, la asignación de especie para una cepa bacteriana dada se realiza en base al porcentaje de identidad del ARNr 16S (ADN del gen ribosomal del 16S) de esa cepa respecto a una cepa tipo o cepa de referencia. Así, se establecen los puntos de corte que oscilan entre el 99,0% y del 99,6%, según el género bacteriano en estudio, para considerar que dos individuos pertenecen a la misma especie [Drancourt, 2000; CLSI]. En el caso de las cepas del género *Nocardia* los requisitos son más estrictos, debiendo superar el 99,6% para ser considerada fiable esta identificación [Petti, 2008]. En un primer momento, debido al menor tamaño de las secuencias estudiadas del ARNr 16S (409-529pb) [Weisburg, 1991], los resultados del análisis del gen ARNr 16S no fueron concluyentes para muchas especies del género *Nocardia*.

En esta memoria se incluyen seis artículos de investigación que exponen las distintas dianas taxonómicas para la identificación y tipificación de cepas clínicas y ambientales pertenecientes a diferentes especies de *Nocardia* spp. En el contexto poblacional del estudio de la nocardiosis, los dos primeros artículos (“Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes” y “*gyrB* analysis as a tool for identifying *Nocardia* species and exploring their phylogeny”) incluyen cepas de *Nocardia* spp. remitidas al Centro Nacional de Microbiología para su identificación a nivel de especie entre los años 2006-2010 clasificadas según su prevalencia en nuestro país. El primer artículo analiza la aplicación de la técnica de referencia, la secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S), y de los genes de la subunidad beta de la topoisomerasa II (*gyrB*) y de la ARN polimerasa/ADN dependiente (*rpoB*) como herramientas de identificación y tipificación en una población de 119 cepas de las especies de alta prevalencia (*Nocardia abscessus*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia farcinica* y el complejo *Nocardia nova*). En el segundo artículo el análisis se focaliza en el gen *gyrB* de una población que incluye 40 cepas de especies de prevalencia media -*Nocardia brasiliensis*, *Nocardia carneae*, *Nocardia otitidiscaviarum* y *Nocardia transvalensis*-, y otras 35 cepas de 18 especies de baja prevalencia en nuestro país.

Pese a sus limitaciones, el análisis del gen ARNr 16S es la técnica de referencia para la identificación de especies, permitiendo una respuesta rápida. Sin embargo, al tratarse de una secuencia muy conservada no se puede aplicar para el estudio de las relaciones intragénicas, siendo necesario la búsqueda de dianas alternativas [Tamura, 2012]. Se ha valorado la utilidad de los genes que codifican para la proteína de choque térmico (*hsp65*), la preproteína translocas de la subunidad SecA1 (*secA1*), la subunidad β de la enzima ADN topoisomerasa tipo II (*gyrB*) y la subunidad β de la enzima ARN polimerasa (*rpoB*) [Kong, 2010; Jannat-Khah, 2010; Takeda, 2010; Rodríguez-Nava, 2006]. En los estudios basados en el gen *secA1* en *Nocardia* se observaron divergencias en la identificación a nivel de especie respecto a los datos basados en ARNr 16S si las especies son muy cercanas filogenéticamente, como ocurre con *N. abscessus* y *N. asiatica* [Kong, 2010]. El gen *hsp65* muestra mejor poder discriminatorio a nivel de especie, pero menor que los genes *gyrB* y *rpoB* [McTaggart, 2010; Takeda, 2010]. A partir de los resultados de su estudio de 2010, que incluía 56 cepas de referencia de *Nocardia* spp., Takeda y colaboradores [Takeda, 2010] realizaron una propuesta de un punto de corte basado en el porcentaje de similitud del gen *gyrB* del 93,5%, para la asignación de especies. En el caso del gen *rpoB*, el punto de corte recomendado para una amplia selección de géneros bacterianos fue de 94,0% [Adékambi, 2008]. Al considerar estos valores de identificación para ambos genes, los valores de identidad para el gen *gyrB* superaron este punto de corte para todas las cepas de alta prevalencia. Para el gen *rpoB*, los valores de identidad de *N. cyriacigeorgica* y *N. farcinica* sí superaron el punto de corte para la asignación de especie, pero no así el total de las cepas de *N. abscessus* y del complejo *N. nova*. En las demás especies, el análisis de *gyrB* confirmó la identificación basada en la secuencia completa del gen ARNr 16S en el 57,5% de las cepas de especies de prevalencia media y en el 60% de las especies de baja prevalencia, mejorando la identificación de especies como *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. higoensis*, *N. ignorata*, *N. paucivorans*, *N. pneumoniae*, *N. puris*, *N. takedensis*, *N. veterana* y *N. vinacea*, pero no en *N. carnea*, *N. transvalensis*, *N. arthritidis*, *N. asteroides*, *N. beijingensis*, *N. elegans*, *N. exalbida*, *N. flavoseosea*, *N. jiangxiensis*, *N. rhamnosiphila*, *N. testacea* o *N. wallacei*. Al comparar cada especie con su cepa de referencia o cepa tipo, se cumplieron simultáneamente los tres criterios ARNr 16S-*gyrB-rpoB* en el 42% de las cepas de las especies prevalentes. Si sólo consideramos simultáneamente los puntos de corte del ARNr 16S y *gyrB*, lo superaron el total de las cepas de especies de alta prevalencia, también de *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum*, el 30% de las cepas de *N. carnea*, ninguna de *N. transvalensis* y el 60% de las cepas de especies de baja prevalencia.

Por otro lado, el análisis de la proteína GyrB fue muy útil. Se observó que las cepas de *N. asiática* presentan una delección en ¹¹⁰Ala, permitiendo así diferenciarlas de otra especie muy próxima, *N. abscessus*. Por otro lado, el complejo *N. nova* se pudo identificar por el análisis del ARNr 16S, sin embargo, el gen *gyrB* mostró mayor variabilidad, como se aprecia en los diferentes motivos observados en las proteínas GyrB correspondientes. La ausencia del ¹²⁹Pro es característica de las cepas de *N. nova sensu stricto*. Simultáneamente, se encontraron tres motivos de proteína GyrB en las posiciones ¹²¹Hys (CAC) - ¹²²Asp

(GAC) de *N. carnea* ATCC 6847^T, lo que sugiere la existencia de tres linajes clonales. Estos resultados son concordantes con estudios taxonómicos previos del gen *gyrB*, donde las especies *N. carnea* y *N. flavorosea* se muestran cercanas filogenéticamente [Takeda, 2010; McTaggart, 2010].

Cuando se estudiaron los valores de diversidad en los genes *gyrB* y *rpoB* según el índice de Hunter y Gaston (HGDI), la variabilidad fue diferente para las distintas especies según su prevalencia, siendo superior a 0,88 para *gyrB* y 1 para *rpoB* en *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica* y el complejo *N. nova*, no así en *N. farcinica* (HGDI de 0,85 y 0,72 para *gyrB* y *rpoB*, respectivamente). Por esto deducimos que ambos genes son adecuados para su uso en estudios de tipificación molecular permitiendo confirmar la transmisión de persona a persona y para identificar infecciones nuevas o recurrentes. Entre las especies más prevalentes, a excepción de las cepas de *N. farcinica*, pudimos observar un alto número de SNPs, tanto en *gyrB* como en *rpoB*, lo que indica la gran diversidad existente en estas cepas clínicas. Respecto a las de media prevalencia, las cepas de *N. carnea* mostraron el mayor número de SNPs en *gyrB* y un rango de similitud similar y no concluyente para su identificación tanto respecto a la cepa de referencia *N. carnea* ATCC 6847^T como a *Nocardia flavorosea* JCM 3332^T. Por su parte, las cepas de *N. transvalensis* presentaron en *gyrB* porcentajes de similitud por debajo del punto de corte para este gen con su cepa de referencia y mostraron mayor similitud con la cepa de referencia de *N. blacklockiae* y *N. wallacei*, por lo que se deduce que ninguna de las cepas de esta población parece pertenecer a *N. transvalensis sensu stricto*, al igual que ocurre en otros estudios anteriores [Conville, 2007]. Las cepas de *N. otitidiscaviarum* fueron las más homogéneas en su secuencia de ARNr 16S, *gyrB* y *GyrB* y presentaron menor números de haplotipos. En el grupo de especies de baja prevalencia, el mayor número de SNPs respecto a su cepa de referencia según la identificación a partir del ARNr 16S lo presentaron las cepas representantes de la especie *N. asteroides* para el gen ARNr 16S, y la especie *N. wallacei* para *gyrB* y la secuencia de *GyrB*. Se observa así que *gyrB* y *rpoB* son dianas taxonómicas complementarias para la identificación por ARNr 16S, cada uno con sus ventajas y limitaciones, según la especie estudiada. Aunque el análisis del ARNr 16S puede no distinguir entre especies, *gyrB* y *rpoB* no deberían ser empleados individualmente para este cometido hasta que se disponga de estudios suficientes que avalen el empleo de estos dos genes conservados en grandes poblaciones de la misma especie [Tayeb, 2008]. Además, debido a la evolución más rápida de ambos genes, los rangos de similitud son más amplios que los permitidos para el gen ARNr 16S [Küpfer, 2006].

Este estudio, que fue el primer trabajo publicado que exploraba la diversidad intra-especie de estos genes en *Nocardia*, permitió establecer tres niveles de diversidad en las especies de alta prevalencia en nuestro país: nivel bajo, en cepas de *N. farcinica*; nivel medio, en *N. abscessus* y *N. cyriacigeorgica*, y nivel alto, en las cepas del complejo *N. nova*. Esto sugiere que la especie *N. farcinica* podría pertenecer a un linaje más joven, debido al menor número de SNPs encontrado. Por otro lado, en las cepas del complejo *N. nova*

identificadas como tales por ARNr 16S existen variaciones en el motivo GyrB ¹²⁶AAAPEH lo que indica la existencia de diferentes sublíneas de reciente aparición. Para el grupo de especies de prevalencia media se observaron también tres niveles de diversidad para el gen *gyrB* y la proteína GyrB: un alto nivel de diversidad para *N. carnea* y *N. transvalensis*, un nivel medio para *N. brasiliensis* y un nivel bajo para *N. otitidiscaviarum*. Excluyendo las especies más prevalentes de *Nocardia* en nuestro país, la identificación basada en la secuencia completa del gen ARNr 16S y *gyrB* son equiparables en algo más de la mitad de la población estudiada. A medida que aumente el número de secuencias disponibles de *gyrB* en las bases de datos, el estudio del gen *gyrB* podrá desempeñar un papel cada vez más importante en la discriminación y la tipificación de cepas de *Nocardia* spp.

Una aproximación práctica de estos resultados lo constituye el tercer artículo, “Traumatic endophthalmitis caused by *Nocardia kruczakiae* in a patient with traumatic eye injury” realizado en colaboración con oftalmólogos del Centro de Oftalmología Barraquer y el Institut Universitari Barraquer, de Barcelona. La córnea y la cámara anterior del ojo son tejidos con características inmunes complejas, lo que puede explicar la aparición de infecciones oculares o endoftalmitis por *Nocardia* spp. en pacientes inmunocompetentes [Decroos, 2011; Reddy, 2010]. Este artículo describe el caso de un niño de 5 años que sufrió un traumatismo ocular por una hoja de palmera. Aunque el análisis del ARNr 16S suele proporcionar una identificación definitiva, las especies estrechamente relacionadas no pueden diferenciarse, debido al bajo nivel de polimorfismos entre especies y la existencia de múltiples copias del gen que codifica para el ARNr 16S en el caso del complejo *N. nova* [Conville, 2005; Reddy, 2010]. De hecho, especies como *N. africana*, *N. aobensis*, *N. cerradoensis*, *N. nova*, *N. kruczakiae* y *N. veterana* aparecen en el mismo grupo incluso cuando se aplica el análisis por MLSA [McTaggart, 2010]. Entre los genes que se incluye en este esquema MLSA, *rpoB* y *gyrB* han demostrado mayor diversidad que ARNr 16S y *hsp65* y, por lo tanto, permiten una identificación más precisa [McTaggart, 2010]. Los genes *rpoB* y *gyrB* de la cepa CNM997/10 mostraron una similitud de 100 y 99,3%, respectivamente, con *N. kruczakiae* DSM 44877^T, indicando su pertenencia a esta especie. Esto concuerda con el estudio de sensibilidad, pues esta cepa también mostró el mismo perfil de resistencia que el descrito por primera vez para *N. kruczakiae* [Conville, 2005].

Tras conocer las limitaciones que presentaba la técnica de referencia (ARNr 16S) para la identificación del género *Nocardia* -como sucede en los trabajos anteriores-, se valoró la capacidad de identificación de la técnica proteómica MALDI-TOF en los diferentes complejos y especies de *Nocardia*, al realizar un análisis similar, pero con proteínas ribosomales. En el momento de la realización de este trabajo, la plataforma MALDI-TOF se encontraba en plena implantación en los laboratorios clínicos para la identificación bacteriana. Y aunque se habían publicado trabajos previos a este respecto [Verroken, 2010; Farfour, 2012; Toyokawa, 2013; Hsueh, 2014], queríamos revisar sus potencialidades en la identificación de una población

bacteriana similar a la que podríamos encontrarnos en nuestro país con la base de datos comercial MALDI Biotyper library v4.0® disponible en ese momento. De forma conjunta, evaluaríamos el papel del MLSA (*gyrB*-ARNr 16S-*hsp65-secA1*) [McTaggart, 2010] como “elemento decisor” en la identificación de cepas de este género. En algunos estudios anteriores que incluían otros bacilos grampositivos como *Lactobacillus* spp., *Listeria monocytogenes* y *Rhodococcus* spp., los valores de identificación obtenidos por MALDI-TOF MS fueron elevados, superando el 80% de las cepas analizadas [Farfour, 2012]. Sin embargo, en otros estudios, encontramos valores menores, como cuando se aplicó la técnica a 15 cepas del género *Kocuria* (26,7%) o a 74 cepas de *Nocardia* spp. (14,9%) [Hsueh, 2014]. En el caso concreto de las cepas de *Nocardia* spp., también se ha constatado la insuficiencia de la base de datos original de uno de los primeros comercializadores de este sistema, Bruker®, hallándose concordancia en la identificación a nivel de especie por los métodos del estudio de la secuencia completa del ARNr 16S y MALDI-TOF MS de solo el 15,6% [Segawa, 2015], 53,0% [Khot, 2015], 42,0% [Buckwalter, 2016] e incluso en ningún caso [Xiao, 2016]. Sin embargo, estos valores llegaron al 90,6, 83,1, 90 y 95%, respectivamente, cuando las bibliotecas comerciales se completaron con espectros propios (biblioteca in-house). El trabajo, titulado “Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter in the Identification of *Nocardia* Species” fue realizado en colaboración con el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Para este estudio se seleccionaron 100 cepas de 30 especies distintas, incluidas en tres grupos según su prevalencia en España [Carrasco, 2013; Carrasco, 2015]: 25 cepas del grupo de alta prevalencia (*N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* y complejo *N. nova*); 20 cepas de grupo de prevalencia intermedia (*N. brasiliensis*, *N. carneae*, *N. otitidiscaviarum*, y el complejo *N. transvalensis*) y 55 cepas del grupo de baja prevalencia (de 22 especies distintas).

Así pues, aunque se observó concordancia en la identificación a nivel de especie entre ARNr 16S y MALDI-TOF MS para el 76% de las especies del grupo de alta prevalencia, esta cifra descendió al 45% y 9,1%, para las cepas de prevalencia intermedia y baja, respectivamente. El escaso número de espectros disponible en la base de datos comercial de Bruker® de alguna de las especies de alta prevalencia (como el complejo *N. nova*), de prevalencia intermedia (especialmente para *N. carneae* y el complejo *N. transvalensis*) y para especies inusuales y recientemente descritas de *Nocardia*, ocasiona una falta de identificación por MALDI-TOF MS. Esto pone de manifiesto la debilidad de las bases de datos comercial Bruker v. 4.0 para alcanzar una adecuada identificación en determinadas especies y complejos del género *Nocardia* y la necesidad de la ampliación en el número y variedad de los espectros incluidos. Además, se identificaron más del 10% de las cepas examinadas como *Lactobacillus* spp., coincidiendo con estudios anteriores [Hsueh, 2014].

En los 67 casos para los que la identificación fue discrepante entre ARNr 16S y MALDI-TOF MS, esta divergencia se resolvió aplicando el método *Multilocus sequence analysis* (MLSA) *gyrB*-16SrRNA-*secA1-hsp65* (1790pb) como árbitro o criterio decisor, debido a su alto poder de resolución a nivel de especie [Glaeser y Kämpfer, 2015]. De este grupo no concordante a nivel de especie, 34 cepas fueron concordantes en el género asignado mediante ARNr 16S y MALDI-TOF MS, pero no en la asignación a nivel de especie. Sus porcentajes de similitud del concatenado MLSA para cada cepa con respecto a su respectiva secuencia de referencia para los subgrupos de prevalencia alta, intermedia y baja fueron de 94,4-98,9%, 96,9-97,6% y 94,4-100%, respectivamente. En las 33 cepas restantes (25 de ellas pertenecientes al grupo de baja prevalencia) no coincidió la identificación a nivel de especie ni de género por ARNr 16S y MALDI-TOF MS. En este caso, MLSA confirmó 16 identificaciones realizadas por ARNr 16S y ninguna identificación de MALDI-TOF MS, con unos rangos de similitud del concatenado MLSA para cada cepa con respecto a su secuencia de referencia de 99,8% (solo hubo una cepa), 91,2-96,1 y 94,7-99,4%, en los subgrupos de alta, intermedia y baja prevalencia, respectivamente.

Encontramos limitaciones importantes en este esquema de MLSA: i) la ausencia de puntos de corte para asignación de especie para el concatenado empleado; ii) la falta de asignación de codificación de alelos; iii) la ausencia de disposición de base de datos para las secuencias de estos genes y de sus concatenados. Aun así, hasta ese momento constituía el mejor método disponible para la asignación de especies de *Nocardia*, más laborioso en su realización y análisis que ARNr 16S o MALDI-TOF MS, sin recurrir a la secuenciación del genoma completo. Por estas razones, su empleo no está extendido a nivel de los laboratorios de diagnóstico clínico, circunscribiéndose principalmente a los centros de referencia.

Trabajos posteriores a nuestro estudio confirman que la técnica MALDI-TOF ha sido implementada y actualmente puede garantizar la rapidez, precisión y bajo coste en la identificación de la mayoría de los aislamientos de *Nocardia* spp. encontrados en la rutina del laboratorio de microbiología. Sin embargo, deberíamos continuar siendo especialmente cautelosos en la identificación de cepas pertenecientes a determinadas especies de muy baja frecuencia con un bajo número de entradas o inexistente (*N. puris*, *N. rhamnosiphila* y *N. shimofusensis*, entre otras), así como las perteneciente a complejos constituidos por especies estrechamente relacionadas (los complejos *N. nova* y *N. transvalensis*).

Tras la experiencia adquirida con la utilización de diferentes dianas moleculares como son ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* y el esquema tetragénico MLSA, para una correcta asignación taxonómica en el género *Nocardia*, el paso natural siguiendo los avances de la técnica fue la secuenciación del genoma completo. Se seleccionó una cepa clínica de *Nocardia cerradoensis*, una especie reseñada como nuevo patógeno

emergente [Piau, 2015; Ercibengoa, 2016]. *N. cerradoensis* se aisló por primera vez en 2003 en El Cerrado, Brasil [Albuquerque, 2003], y el primer caso humano de infección diseminada se informó en 2015 [Piau, 2015]. Ese mismo año fue descrito un caso de infección cutánea por *N. cerradoensis* en España [Escudero-Jimenez, 2015]. De dicha especie sólo se había publicado hasta el momento el genoma completo de una cepa ambiental, que es la cepa de referencia [Albuquerque, 2003]. En el quinto artículo incluido, titulado “First Draft Genome Sequence of a Clinical Strain of *Nocardia cerradoensis*”, se describe el genoma completo de la cepa CNM20130759, perteneciente a la especie *N. cerradoensis*, aislada de una infección cutánea post-infiltración en la rodilla de una mujer inmunocompetente de 52 años [Escudero-Jiménez, 2016].

Gracias al apoyo de la Unidad de Bioinformática y el Laboratorio de Genómica del Instituto de Salud Carlos III se secuenció mediante la plataforma Illumina NextSeq 500 el único genoma disponible hasta el momento de una cepa clínica de *N. cerradoensis*. Se obtuvo un genoma con una longitud de 8.193.765 pb (con 150 contigs de tamaño superior a 500 pb y un tamaño máximo de contig de 1.035.523 pb, un valor N50 de 394.043 pb) y un contenido de G+C de 68,16%. De esta forma, se realizó la predicción de 8.406 genes (8.329 secuencias codificantes de proteínas, 5 genes de ARNr, 1 ARN mensajero, 71 RNA de transferencia y 543 péptidos señal. Entre los genes codificantes de proteínas, 2.060 fueron únicos y 704 repetidos de 2 a 41 veces.

Uno de los principales criterios para la asignación de especies bacterianas es la similitud genómica determinada por hibridación ADN-ADN (DDH), un método engorroso y propenso a errores [Rosselló-Móra, 2015]. Las mejoras en la secuenciación masiva han aportado otras herramientas como la identidad promedio de nucleótidos (ANI), la correlación de frecuencias de tetranucleótidos (TETRA) y el cálculo de la distancia genoma a genoma, o DDH *in silico* [Colston, 2014]. Entre estas herramientas, en la fecha de publicación de este artículo, ANI había demostrado, basándose en el estudio de 1.226 cepas bacterianas, que un valor de corte ANI de $\geq 0,92$ se puede emplear para la identificación rápida de especies bacterianas [Zhang, 2014]. Según el software ANI esta cepa clínica mostró una similitud del 99,4%, con el genoma de *N. cerradoensis* W9747^T (una bacteria del suelo), que tiene una longitud de 7,6 Mbp, un contenido de G+C de 68,16%, 7.216 genes que codifican para proteínas (8 rRNAs) y un CRISPR. Estos resultados fueron consistentes con la identificación previa a partir de ARNr 16S, *gyrB* y el esquema MLSA. Por otro lado, a secuenciación del genoma completo permitió detectar un gran número de genes relacionados con la resistencia a antibióticos, codificadores para bombas de flujo, genes de virulencia, diversos grupos de genes biosintéticos y un profago intacto. Por nuestra experiencia posterior, la presencia de profagos completos no es un hecho frecuente en este género.

Esta capacitación inicial en la secuenciación de genomas completos nos condujo al estudio de cepas de suelo de *Nocardia* spp., un patógeno primordialmente ambiental, y a su comparación con las cepas clínicas previamente estudiadas en el artículo “Molecular characterization and antimicrobial susceptibilities of *Nocardia* species isolated from the soil; a comparison with species isolated from humans”. Se abordó con especial referencia a *Nocardia cyriacigeorgica* por presentar mayor prevalencia en nuestro país y ser una de las causas más comunes de nocardiosis humana a nivel mundial [Valdezate, 2017].

Nocardia spp. contribuye a la salud del suelo, desempeñando un papel importante en los ciclos de la materia orgánica, inhibiendo el crecimiento de patógenos que comparten el mismo nicho ecológico y descomponiendo los restos de plantas y animales muertos [Goodfellow, 2012; Bhatti, 2017]. Los estudios previos confirman la presencia de *Nocardia* spp. aislada de diferentes suelos y en entornos acuáticos como productores de nuevas sustancias bioactivas [Schneider, 2007; El-Gendy, 2008], y degradadores de compuestos orgánicos complejos de ambientes contaminados por desechos industriales o por petróleo [Berekaa, 2006], lo que indica que este género posee una potente versatilidad metabólica. Tanto el pH del suelo como el clima y el tipo de vegetación afectan la frecuencia y diversidad de la actividad aeróbica del suelo de las actinobacterias [Kachuei, 2012]. Debido a que la presencia de cepas de *Nocardia* spp. en el medio ambiente representan un riesgo para la salud humana, reflejado en la alta incidencia de micetoma en áreas rurales del estado de Lara (Venezuela) [Ramírez, 2003], se realizó un estudio en colaboración con el Laboratorio de Microbiología de Suelos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes (Mérida-Venezuela). Se seleccionaron 38 cepas de 7 municipios diferentes del Estado de Lara, Venezuela, en dos periodos distintos (08/2002 y 05/2006) donde el clima es continental semiárido e interior subhúmedo. Aunque el género *Nocardia* abarca un gran número de especies, mediante ARNr 16S solo se detectaron siete especies, siendo *N. cyriacigeorgica* la especie predominante (71,8%). En España también se ha comunicado previamente la existencia de cepas de *N. cyriacigeorgica* en muestras de suelo [Valero-Guillén, 1984]. Es de destacar que *Nocardia brasiliensis*, el principal agente causal del micetoma en el estado de Lara, no fue aislado en ninguna de las ubicaciones seleccionadas [Ramírez, 2003]. Aunque otros estudios confirman a *N. brasiliensis* como el responsable de más de la mitad de las infecciones de tejidos blandos y huesos por infiltración [Valdezate, 2017], en otros estudios realizados con aislados procedentes de suelos, al igual que en las muestras de Venezuela, esta especie no fue detectada [Valero-Guillén, 1984]. Esto podría explicarse porque los actinomicetos son 3–5,6 veces más abundantes en las muestras del aire sobre el suelo que en el mismo suelo [Weber y Werth, 2015]. El análisis de *gyrB* confirmó la identificación por ARNr 16S en el 71% de los casos. Por su parte, MLSA confirmó los resultados de ARNr 16S y *gyrB* en el 89,5% y 71% de las cepas, respectivamente. Las cepas de suelo mostraron un fenotipo de sensibilidad que corresponde por completo a su respectivo patrón de

sensibilidad según las distintas especies [Brown-Elliott, 2015], a excepción de la cepa del suelo *Nocardia asteroides*, que fue sensible a aminoglucósidos y claritromicina. Por su parte, la cepa de *Nocardia mexicana* mostró un espectro de resistencia más amplio del esperado.

Dado el fuerte predominio de las cepas de *N. cyriacigeorgica* en los suelos muestreados, se compararon sus secuencias de ARNr 16S, *gyrB* y *GyrB*, índice de discriminación de Hunter-Gaston (IDHG) [Hunter, 1998], polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y sensibilidad antimicrobiana con la población clínica de esta especie caracterizadas previamente [Carrasco, 2013]. El alto índice de discriminación de las cepas clínicas de *N. cyriacigeorgica* indica que son más diversas que las cepas de suelo (0,940 frente a 0,761), sin embargo, en comparación con la cepa tipo *N. cyriacigeorgica* DSM 44484^T (de origen clínico), las cepas de suelo mostraron mayor número de SNPs y en un rango más amplio por cepa que las cepas clínicas (212 vs. 77 y 1-109 vs. 0-38). Esta contradicción entre un menor índice de diversidad y un mayor número de polimorfismos nos indicó la presencia de un posible evento diferencial. De estas, casi el 70% de las cepas de *N. cyriacigeorgica* del suelo se agruparon en la misma rama del árbol Neighbour-Joining basado en el gen *gyrB* y el esquema de MLSA. Este grupo lo denominamos como “*soil-only cluster*” o clúster específico de suelo. También se hallaron diferencias en el perfil de sensibilidad de las cepas de *N. cyriacigeorgica* pertenecientes a este clúster, con mayor sensibilidad a betalactámicos, fluoroquinolonas y minociclina y mayor resistencia a claritromicina que las cepas humanas. Esto podría ser el resultado de una exposición reducida a agentes antimicrobianos presentes en suelo, o quizás a la baja resistencia intrínseca de esta nueva variante o linaje de *N. cyriacigeorgica*.

Estamos asistiendo a un rápido y continuo progreso de las tecnologías de secuenciación masiva y al auge de la clasificación taxonómica basada en las secuencias del genoma completo y las herramientas bioinformáticas asociadas. Estas han proporcionado un aumento en la fiabilidad, pues el *bootstrap* o promedio de la robustez de las ramas de los árboles basados en la secuencia del genoma es bastante más alto que en los árboles basados en la secuencia de un sólo gen [Meier-Kolthoff, 2014; Nouioi, 2018]. Dada la reducción del coste y el tiempo de respuesta de las técnicas de secuenciación masiva, la asignación de especies por secuenciación del genoma completo (WGS) se está convirtiendo en un enfoque taxonómico más factible [Gallegos, 2020]. Para alcanzar un mayor conocimiento de esta nueva variante identificada de *N. cyriacigeorgica*, 6 cepas representativas del total de *N. cyriacigeorgica* del suelo (4 del clúster específico de suelo y 2 de otras ramas del árbol de *gyrB*), fueron sometidas a secuenciación masiva. La asignación de especies se confirmó comparando la identidad promedio de nucleótidos (ANI) [Yoon, 2017], la identidad promedio de aminoácidos (AAI) [Rodríguez-R, 2014], y la distancia genoma a genoma *in silico* (GGDC) [Meier-Kolthoff, 2013] frente al genoma de referencia *N. cyriacigeorgica* GUH-2 y el genoma de la cepa tipo DSM 44484^T. Los puntos de corte para alcanzar una asignación de especie correcta o la probable

pertenencia a una nueva especie son $> 95\%$ ANI / AAI, $> 70\%$ estimación DDH y una diferencia $< 1\%$ en el contenido en G + C [Thompson, 2013; Rodríguez y Kostantinidis, 2016; Varghese, 2015, Chun, 2018]. ANI es una buena herramienta cuando se trata de genomas que comparten 80–100% de identidad, y AAI se emplea para especies con un valor de $< 80\%$ ANI y / o cuando el 30% de su contenido genético es muy diferente [Rodríguez y Kostantinidis, 2016]. Para completar el análisis se incluyeron los 5 genomas de *N. cyriacigeorgica* hasta el momento disponibles en las bases de datos [Vautrin, 2019] y 2 cepas de suelo más lejanas según *gyrB*. Las cuatro cepas del clúster específico de suelo analizadas por WGS mostraron valores promedio de ANI y AAI de $\sim 87\%$ con respecto al genoma de referencia de la cepa GUH-2 y algo menores respecto a DSM 44484^T, junto con una estimación media de DDH del 31,6% y 31,5% y diferencias de contenido de G + C de alrededor del 1,5% y 1,37% respecto a GUH-2 y DSM 44484^T, respectivamente. Sin embargo, entre ellas mostraron mayores valores de similitud (ANI $\sim 99,7\%$). Estos valores de ANI y AAI rondaron el 90%-92%, y diferencia $< 1\%$ en el contenido de G + C para los genomas disponibles, lo que confirma su pertenencia a la especie *N. cyriacigeorgica*. Mediante el servidor TrueBacTM [Ha, 2019] para el clúster específico de suelo los valores de ANI obtenidos con respecto al genoma de referencia GUH-2 fueron $\sim 87,7\%$. Con la plataforma AAI-profiler (*Average Amino-acid Identity*) [Medlar 2018], las AAI de las 4 cepas seleccionadas de este clúster arrojaron valores de $\sim 75\%$; el resto superó el $\geq 80\%$. Cuando se usó el servidor TYGS (*Type Strain Genome Service*) [Meier-Kolthoff, 2019] para determinar AAI con respecto a GUH-2 y DSM 44484^T, las cepas del clúster específico de suelo mostraron $> 1\%$ de diferencia en el contenido de G + C, a diferencia de las demás. Por el contrario, cuando se compararon entre sí, los criterios de ANI/AAI - DDH estimado - y las diferencias en % de G + C, indicaron la pertenencia a una misma especie. Además, en el árbol filogenético generado por el servidor GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*), las cepas del clúster específico de suelo se agrupan separadas de las demás cepas de *N. cyriacigeorgica*, algo indicativo de un nuevo linaje o especie. Usando la plataforma chewBBACA, se aplicó el novedoso método de tipificación cgMLST (*core genes multilocus sequence typing*) basado en 3.048 loci presentes en todas las bacterias, independientemente de cualquier cepa de comparación [Silva, 2018]. También se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando el software bcgTree que se basa en 107 proteínas conservadas y presentes en una sola copia en todas las bacterias [Stamatakis, 2014]. En el dendrograma basado en cgMLST, el genoma de la cepa tipo NBRC 100375, análoga de DSM 44484^T, se colocó en el nodo central del que emergen seis linajes distintos, siendo el linaje 5 el que incluye todas las cepas del clúster específico de suelo, difiriendo en 3.047 alelos con respecto al nodo central de NBRC 100375/ DSM 44484^T, y entre ellos una media de 1.594 alelos. El análisis bcgTree también mostró el agrupamiento de las cepas del clúster específico de suelo en un único grupo, diferenciándolo con robustez del resto de los grupos. Estos hallazgos sugieren la existencia de una nueva especie para la que se propone el nombre *Nocardia venezuelensis*, y a la que pertenecerían las cuatro cepas secuenciadas del clúster específico de suelo.

Los trabajos que componen esta tesis doctoral presentan un denominador común, la evolución de la metodología de la Taxonomía bacteriana desde la Taxonomía polifásica, con inclusión de diferentes tipos de dianas, y con especial consideración de las más novedosas, a la Taxonomo-genómica, con el estudio del genoma completo y del proteoma. Estos estudios nos han proporcionado una visión global de las características de las especies de *Nocardia* spp. implicadas en infecciones en humanos y de sus relaciones filogenéticas intra- e inter-especies en nuestro país, así como la evolución de la metodología asociada.

CONCLUSIONES



1. En una población de 698 cepas clínicas enviadas al Centro Nacional de Microbiología durante un período de cinco años (2006-2010) para su identificación, las especies de *Nocardia* que muestran una mayor prevalencia en nuestro país son *N. cyriacigeorgica* (24,5%), *N. farcinica* (13,6%), *N. abscessus* (15,9%), y el complejo *N. nova* (13,0%), siendo estas cuatro especies responsables de más de la mitad de los casos clínicos de nocardiosis humana (67,0%).

En la identificación de las cepas de *Nocardia* spp., la secuenciación parcial del gen ARNr 16S no es capaz de diferenciar entre especies cercanas filogenéticamente debido a su escasa variabilidad, siendo necesario la secuenciación completa.

2. Todas las cepas de las especies *N. cyriacigeorgica* y *N. farcinica* mostraron valores de identidad superiores al punto de corte para asignación de especie según *gyrB* ($\geq 93,5\%$), pero no todas las cepas del complejo *N. nova*. El estudio de *GyrB* permitió la discriminación entre *N. abscessus* y *N. asiática* y la diferenciación de las especies del complejo *N. nova* por las variaciones en el motivo ¹²⁶AAAPEH.

El análisis de los genes *gyrB* y *rpoB* ofrece ventajas para el estudio de las relaciones inter- e intraespecie respecto al gen ARNr 16S. Pues al considerar una población de estudio de aproximadamente 30 cepas de *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* y del complejo *N. nova*, el poder discriminatorio individual de *gyrB* y *rpoB* con respecto a la tipificación intraespecie, calculado a partir del índice discriminatorio Hunter-Gaston (HGDI), fue generalmente alto (0,85 a 1), excepto para la secuencia de *rpoB* de *N. farcinica* (0,71).

Por su parte, *rpoB* confirmó la identidad (punto de corte $\geq 94,0\%$) en todas las cepas de *N. cyriacigeorgica* y *N. farcinica*, pero no en la totalidad de las cepas de *N. nova* y *N. abscessus* seleccionadas.

Además, desde el punto de vista filogenético se observaron diferentes grados de microheterogeneidad intra e interespecies para *gyrB* y *rpoB*. Todas las especies, excepto *N. farcinica*, presentaron un elevado número de haplotipos para los genes *gyrB* y *rpoB* genes (>12).

3. El estudio de *gyrB* (individualmente o junto al estudio de *rpoB*) ofrece un método sencillo de laboratorio para identificar las especies de *Nocardia* más prevalentes y es útil en la determinación de la diversidad intraespecie. A partir de los resultados se observa un gradiente de diversidad, con *N. farcinica* como la especie más homogénea, seguida de *N. abscessus* y *N. cyriacigeorgica*, y el complejo de *N. nova* como la especie que muestra mayor diversidad. *N. farcinica*, podría pertenecer a un linaje más joven y el

complejo *N. nova* diferenciarse en sublinajes de aparición reciente por las variaciones en el motivo GyrB (¹²⁶AAAPEH). *gyrB* complementa, pero no sustituye el estudio de ARNr 16S como herramienta de identificación.

4. Cuando se seleccionó una población de cepas pertenecientes a especies de *Nocardia* spp. de prevalencia media y baja, el análisis de *gyrB* confirma la identificación mediante la secuencia completa del gen ARNr 16S en el 57,5% y 60%, respectivamente, incluyendo las cepas de *N. brasiliensis* y *N. otitidiscaviarum* (ambas de prevalencia media), *N. brasiliensis*, *N. higoensis*, *N. ignorata*, *N. otitidiscaviarum*, *N. paucivorans*, *N. pneumoniae*, *N. puris*, *N. takedensis*, *N. veterana* y *N. vinacea* (de baja prevalencia). Sin embargo, se observaron discrepancias en la identificación del 70% de las cepas de *N. carnea*, en todas las cepas de *N. transvalensis* (prevalencia media) y otras 12 especies que engloban el 40% de las cepas de *Nocardia* del grupo de baja prevalencia.

Así pues, el estudio del gen *gyrB* ha demostrado ser una herramienta sencilla para la identificación correcta de las especies de *Nocardia* de alta, media y baja prevalencia en nuestro país, y para la determinación de su diversidad intraespecie. Aunque el gen *gyrB* alcanzará su relevancia como herramienta taxonómica aumentará a medida que se incremente el número de secuencias de *Nocardia* spp. para este gen disponibles en las bases de datos.

5. En algunas ocasiones, el bajo polimorfismo interespecies no permite la identificación mediante el ARNr 16S, al no diferenciar entre especies pertenecientes a un mismo complejo o que se hallan filogenéticamente próximas. En un caso de endoftalmitis ocular se determinó la especie responsable, *N. kruczakiae*, previamente descrito como un agente etiológico de neumonía, mediante el análisis de *gyrB* y *rpoB*, pero no mediante ARNr 16S y *hsp65*. De esta forma, se pudo diferenciar la especie *N. kruczakiae* de otras especies pertenecientes al complejo *N. nova*, como son *N. africana*, *N. nova* y *N. veterana*.
6. La técnica MALDI-TOF MS con el equipo Bruker®, software MALDI Biotyper version 3.1 y base de datos MALDI Biotyper library v4.0 puede considerarse una técnica de identificación rápida y aceptable para la mayoría de las cepas pertenecientes al grupo de especies de alta prevalencia en nuestro país (*N. farcinica*, *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica* y el complejo *N. nova*) al proporcionar la misma identificación que el ARNr 16 para el 76% de las cepas examinadas. Para el grupo de prevalencia intermedia (*N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. otitidiscaviarum* y el complejo *N. transvalensis*), esta cifra descendió al 45%. En el grupo de baja prevalencia (22 especies), hubo concordancia solo el 6% de las cepas a nivel de especie, debido principalmente a la ausencia en la base de datos comercial de espectros suficientes representativos de la especie asignada por ARNr 16S, y a la total ausencia de ellos para 9 de estas especies. Se hace relevante el escaso número de espectros en la base de datos de especies

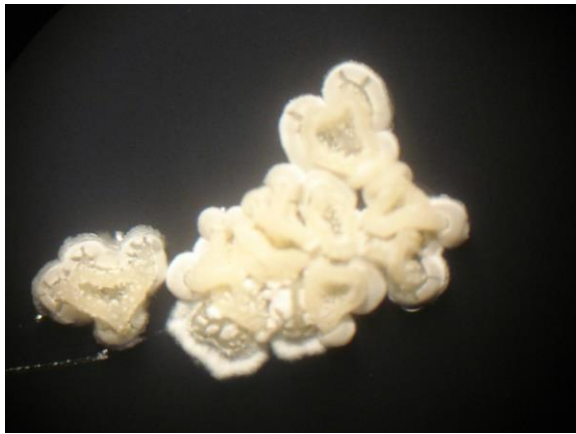
pertenecientes al complejo *N. nova*, de alta prevalencia, *N. carnea* y el complejo *N. transvalensis*, de prevalencia intermedia, y para especies inusuales y recientemente descritas. Hasta que no se incluyan suficientes espectros en la base de datos comercial de MALDI-TOF MS que representen la totalidad de las especies de *Nocardia* circulantes de relevancia clínica, es recomendable mantener la identificación mediante la secuenciación completa del ARNr 16S, con el soporte del *gyrB* y/o MLSA para algunos casos.

7. El esquema tetragénico *multilocus sequence analysis* (MLSA) compuesto por los genes *gyrB*-ARNr 16S-*secA1-hsp65* es útil para identificar la mayoría de las especies de *Nocardia* y para arbitrar entre identificaciones discrepantes por ARNr 16S y MALDI-TOF MS. Aproximadamente el 50% de las cepas identificadas como *Nocardia* sp. por el método ARNr 16S fueron identificadas de forma concordante mediante MLSA. Para *N. cerradoensis*, *N. ignorata* y *N. pneumoniae*, MLSA proporcionó muy buena discriminación. No se pudo confirmar la identificación previa por ARNr 16S de las cepas de *N. wallacei* o *N. blacklockiae*, ni distinguir entre cepas de *N. brevicatena* / *N. paucivorans*, *N. arthritidis* / *N. exalbida* y *N. kruckzakiae* / *N. aobensis* / *N. africana* / *N. nova*. MLSA confirmó los resultados proporcionados a nivel de especie por el análisis ARNr 16S en el 34,3% de las discrepancias, y los proporcionados por MALDI-TOF MS en el 13,4%. Las limitaciones del MLSA incluyen la ausencia de criterios o puntos de corte para la asignación taxonómica de una base de datos que contenga la codificación de alelos y secuencio-tipos.
8. Se realizó la descripción del primer genoma de una cepa clínica de *N. cerradoensis*, propuesta como patógeno emergente por otros grupos. Esta cepa mostró una similitud del 99,4% por el software ANI (*Average Nucleotide Identity*) con el genoma de referencia *N. cerradoensis* W9747^T (una bacteria del suelo), mayor tamaño (0,6 Mpb de diferencia), igual composición en contenido G + C (68,16%), y mayor número de secuencias codificantes de proteínas (1.113 CDS más).
9. Siete especies fueron identificadas en cepas aisladas de suelo mediante la secuenciación de ARNr 16S, siendo mayoritaria la especie *N. cyriacigeorgica* (76,3%). El gen *gyrB* mostró que las cepas del suelo de *N. cyriacigeorgica* eran menos diversas que las cepas de humanos (HGDI 0,761 frente a 0,94), aunque el número y el rango de SNP por cepa era significativamente mayor (212 vs. 77 y 1–109 vs. 0–38), sugiriendo la presencia de algunas cepas atípicas para esta especie. Para todas las especies, las cepas del suelo y las humanas se posicionaron en el árbol filogenético del MLSA junto a la secuencia de referencia correspondiente a su especie según ARNr 16S. Se observaron 3 agrupamientos o clústeres, ubicándose el 65% de las cepas de *N. cyriacigeorgica* de suelo en un clúster diferenciado. No se

encontraron diferencias genéticas significativas, ni diferencias en la sensibilidad antimicrobiana entre las cepas de *Nocardia* de suelo, clínicas y de referencia, excepto en el caso de las cepas de *N. cyriacigeorgica*.

10. El estudio del genoma completo de 4 cepas de *N. cyriacigeorgica* pertenecientes al grupo específico de suelo, con valores de identidad promedio de nucleótidos (ANI)/de aminoácidos (AAI) y de la distancia genoma a genoma *in silico* (GGDC, DDH-estimado) inferiores al < 95% y < 70%, respectivamente, junto con un contenido en G+C > 1%, sugieren la descripción de una nueva especie, *Nocardia venezuelensis* sp. nov., o de una subespecie del complejo *N. cyriacigeorgica*.

BIBLIOGRAFÍA



1. Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in microbiology*, 17(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
2. Al Akhrass, F., Hachem, R., Mohamed, J. A., Tarrand, J., Kontoyiannis, D. P., Chandra, J., Ghannoum, M., Haydoura, S., Chaftari, A. M., & Raad, I. (2011). Central venous catheter-associated *Nocardia* bacteremia in cancer patients. *Emerging infectious diseases*, 17(9), 1651–1658. <https://doi.org/10.3201/eid1709.101810>
3. Albuquerque de Barros, E., Manfio, G. P., Ribeiro Maitan, V., Mendes Bataus, L. A., Kim, S. B., Maldonado, L. A., & Goodfellow, M. (2003). *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(Pt 1), 29–33. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02020-0>
4. Ambrosioni, J., Lew, D., & Garbino, J. (2010). Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection*, 38(2), 89–97. <https://doi.org/10.1007/s15010-009-9193-9>
5. Andalibi, F., Mehdi, F.B., Parvin, H., Masoumeh, R.N., Shadi, H., Mohammad, R.P., Eshraghi, S.S. (2015). Isolation and identification of *Nocardia* spp. using phenotypic methods from soil samples of North Khorasan province. *Journal of Medical Bacteriology*. 4,8–14
6. Ankenbrand, M. J., & Keller, A. (2016). bcgTree: automatized phylogenetic tree building from bacterial core genomes. *Genome*, 59(10), 783–791. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0175>
7. Balloux, F., Brønstad Brynildsrud, O., van Dorp, L., Shaw, L. P., Chen, H., Harris, K. A., Wang, H., & Eldholm, V. (2018). From theory to practice: translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the clinic. *Trends in microbiology*, 26(12), 1035–1048. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.004>
8. Bambace, N. M., Poirier, L., Cohen, S., Kiss, T., Sauvageau G., Roy, J., Roy D. C., Chagnon, M. & Lachance, S. (2013). Nocardiosis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a matched case-control study of risk factors, clinical features and outcomes. *Biology of Blood Marrow Transplant*, 19, S280.
9. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
10. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2015). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
11. Beaman, B. L., & Beaman, L. (1994). *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clinical microbiology reviews*, 7(2), 213–264. <https://doi.org/10.1128/cmr.7.2.213>
12. Berekaa, M. M. (2006). Colonization and microbial degradation of polyisoprene rubber by nocardioform actinomycete *Nocardia* sp. strain-MBR. *Biotechnology*, 5(3), 234-239.

13. Bernardin Souibgui, C., Zoropogui, A., Voisin, J., Ribun, S., Vasselon, V., Pujic, P., Rodriguez-Nava, V., Belly, P., Cournoyer, B., & Blaha, D. (2017). Virulence test using nematodes to prescreen *Nocardia* species capable of inducing neurodegeneration and behavioral disorders. *PeerJ*, 5, e3823. <https://doi.org/10.7717/peerj.3823>
14. Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, 111, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>
15. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
16. Bolon, B., Buergelt, C. D., & Cooley, A. J. (1989). Abortion in two foals associated with *Nocardia* infection. *Veterinary pathology*, 26(3), 277–278. <https://doi.org/10.1177/030098588902600314>
17. Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S., & Wallace, R. J., Jr (2006). Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 259–282. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.259-282.2006>
18. Brown-Elliott, B. A., Fritsche, T. R., Olson, B. J., Vasireddy, S., Vasireddy, R., Iakhiaeva, E., Alame, D., Wallace, R. J., & Branda, J. A. (2019). Comparison of Two Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *American journal of clinical pathology*, 152(4), 527–536. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz073>
19. Buckwalter, S. P., Olson, S. L., Connelly, B. J., Lucas, B. C., Rodning, A. A., Walchak, R. C., Deml, S. M., Wohlfiel, S. L., & Wengenack, N. L. (2016). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and other Aerobic Actinomycetes. *Journal of clinical microbiology*, 54(2), 376–384. <https://doi.org/10.1128/JCM.02128-15>
20. Cantón R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 1, 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x>
21. Carrasco, G., de Dios Caballero, J., Garrido, N., Valdezate, S., Cantón, R., & Sáez-Nieto, J. A. (2016). Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS database and use of MLSA as an arbiter in the identification of *Nocardia* species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 542. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00542>
22. Carrasco, G., Monzón, S., Jiménez, P., Cuesta, I., Bartolomé-Alvarez, J., & Valdezate, S. (2017). First draft genome sequence of a clinical strain of *Nocardia cerradoensis*. *Genome Announcements*, 5 (39), e00551-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00551-17>
23. Carrasco, G., Monzón, S., San Segundo, M., García, E., Garrido, N., Medina-Pascual, M. J., Villalón, P., Ramírez, A., Jiménez, P., Cuesta, I., & Valdezate, S. (2020). Molecular characterization and antimicrobial

- susceptibilities of *Nocardia* species isolated from the soil; a comparison with species isolated from humans. *Microorganisms*, 8(6), 900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060900>
24. Carrasco, G., Valdezate, S., Garrido, N., Medina-Pascual, M. J., Villalón, P., & Sáez-Nieto, J. A. (2015). *gyrB* analysis as a tool for identifying *Nocardia* species and exploring their phylogeny. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 997–1001. <https://doi.org/10.1128/JCM.03072-14>
25. Carrasco, G., Valdezate, S., Garrido, N., Villalón, P., Medina-Pascual, M. J., & Sáez-Nieto, J. A. (2013). Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3602–3608. <https://doi.org/10.1128/JCM.00515-13>
26. Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(16), 3422–3423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>
27. Casali, N., & Riley, L. W. (2007). A phylogenomic analysis of the Actinomycetales *mce* operons. *BMC genomics*, 8, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-60>
28. Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
29. Chan, J. Z., Halachev, M. R., Loman, N. J., Constantinidou, C., & Pallen, M. J. (2012). Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC microbiology*, 12, 302. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-302>
30. Chedid, M. B., Chedid, M. F., Porto, N. S., Severo, C. B., & Severo, L. C. (2007). Nocardial infections: report of 22 cases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(4), 239–246. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652007000400009>
31. Chen, J., Frediansyah, A., Männle, D., Straetener, J., Brötz-Oesterhelt, H., Ziemert, N., Kaysser, L., & Gross, H. (2020). New nocobactin derivatives with antimuscarinic activity, terpenibactins A-C, revealed by genome mining of *Nocardia terpenica* IFM 0406. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 10.1002/cbic.202000062. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000062>
32. Chen, W., Liu, Y., Barkema, H. W., Gao, J., De Buck, J., Kastelic, J. P., Liu, G., Ali, T., Shahid, M., & Han, B. (2017). Short communication: Molecular characteristics, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of clinical *Nocardia cyriacigeorgica* isolates from an outbreak of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8414–8421. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12680>
33. Chimara, E., Ferrazoli, L., Ueky, S. Y., Martins, M. C., Durham, A. M., Arbeit, R. D., & Leão, S. C. (2008). Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-*hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. *BMC Microbiology*, 8, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-48>
34. Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome

data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461–466. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>

35. Churgin, S. M., Teng, J., Ho, J., Graydon, R., Martelli, P., Lee, F. K., Hui, S. W., Fong, J., Lau, S., & Woo, P. (2019). First case report of fatal *Nocardia nova* infection in yellow-bibbed lory (*Lorius chlorocercus*) identified by multilocus sequencing. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1764-x>

36. CLSI Susceptibility testing of *Mycobacterium*, *Nocardia* spp. and other aerobic actinomycetes. 3rd ed. CLSI standard M24. Wayne, PA.; 2018.

37. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., & Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>

38. Colston, S. M., Fullmer, M. S., Beka, L., Lamy, B., Gogarten, J. P., & Graf, J. (2014). Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *mBio*, 5(6), e02136. <https://doi.org/10.1128/mBio.02136-14>

39. Compte, R. B., Martínez-Osorio, H., Carrasco, G., Lorente, B., Elizalde, J., Valdezate, S., Lorente, R., Iglesias, E., & Saez-Nieto, J. A. (2015). Traumatic endophthalmitis caused by *Nocardia kruczakiae* in a patient with traumatic eye injury. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 5(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12348-015-0067-7>

40. Conville, P. S., & Witebsky, F. G. (2005). Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2881–2885. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2881-2885.2005>

41. Conville, P. S., & Witebsky, F. G. (2007). Organisms designated as *Nocardia asteroides* drug pattern type VI are members of the species *Nocardia cyriacigeorgica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2257–2259. <https://doi.org/10.1128/JCM.00133-07>

42. Conville, P. S., Brown-Elliott, B. A., Smith, T., & Zelazny, A. M. (2017). The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), e01419-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01419-17>

43. Conville, P. S., Brown-Elliott, B. A., Wallace, R. J., Jr, Witebsky, F. G., Koziol, D., Hall, G. S., Killian, S. B., Knapp, C. C., Warshauer, D., Van, T., Wengenack, N. L., Deml, S., & Woods, G. L. (2012). Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1270–1280. <https://doi.org/10.1128/JCM.00994-11>

44. D'Atanasio, N., Capezzone de Joannon, A., Di Sante, L., Mangano, G., Ombrato, R., Vitiello, M., Bartella, C., Magarò, G., Prati, F., Milanese, C., Vignaroli, C., Di Giorgio, F. P., & Tongiani, S. (2020). Antibacterial activity of novel dual bacterial DNA type II topoisomerase inhibitors. *PloS One*, 15(2), e0228509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228509>

45. de Man, T. J., & Limbago, B. M. (2016). SSTAR, a stand-alone easy-to-use antimicrobial resistance gene predictor. *mSphere*, 1(1), e00050-15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00050-15>
46. DeCroos, F. C., Garg, P., Reddy, A. K., Sharma, A., Krishnaiah, S., Mungale, M., Mruthyunjaya, P., & Hyderabad Endophthalmitis Research Group (2011). Optimizing diagnosis and management of *Nocardia* keratitis, scleritis, and endophthalmitis: 11-year microbial and clinical overview. *Ophthalmology*, 118(6), 1193–1200. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.10.037>
47. Delcher, A. L., Salzberg, S. L., & Phillippy, A. M. (2003). Using MUMmer to identify similar regions in large sequence sets. *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 10. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1003s00>
48. Dhakal, D., Kumar Jha, A., Pokhrel, A., Shrestha, A., & Sohng, J. K. (2016). Genetic manipulation of *Nocardia* species. *Current Protocols in Microbiology*, 40, 10F.2.1–10F.2.18. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10f02s40>
49. Dhakal, D., Rayamajhi, V., Mishra, R., & Sohng, J. K. (2019). Bioactive molecules from *Nocardia*: diversity, bioactivities and biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(3-4), 385–407. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-02120-y>
50. Díaz-Corrales, F. J., Colasante, C., Contreras, Q., Puig, M., Serrano, J. A., Hernández, L., & Beaman, B. L. (2004). *Nocardia otitidiscaviarum* (GAM-5) induces parkinsonian-like alterations in mouse. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 37(4), 539–548. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000400011>
51. Dohoo I. R. (1991). Canada. Update on *Nocardia* sp. mastitis. *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne*, 32(2), 116
52. Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(1), 88–94. <https://doi.org/10.1086/518605>
53. Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623–3630. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3623-3630.2000>
54. Duggal, S. D., & Chugh, T. D. (2020). Nocardiosis: a neglected disease. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 10.1159/000508717. <https://doi.org/10.1159/000508717>
55. Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., & Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 133–138. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>
56. El-Gendy, M. M., Hawas, U. W., & Jaspars, M. (2008). Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *The Journal of Antibiotics*, 61(6), 379-386. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.53>

57. Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M., Hopkins, K. L., Iredell, J., Kahlmeter, G., Köser, C. U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., Rolain, J. M., Samuelsen, & Woodford, N. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(1), 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>
58. Eppinger, H. 1891. Uber eine neue pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (*Cladothrichica*). *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.* 9:287–328
59. Ercibengoa, M., Càmara, J., Tubau, F., García-Somoza, D., Galar, A., Martín-Rabadán, P., Marin, M., Mateu, L., García-Olivé, I., Prat, C., Cilloniz, C., Torres, A., Pedro-Botet, M. L., Ardanuy, C., Muñoz, P., & Marimón, J. M. (2020). A multicentre analysis of *Nocardia pneumonia* in Spain: 2010-2016. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 90, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.032>
60. Ercibengoa, M., Pérez-Trallero, E., & Marimón, J. M. (2016). Autochthonous *Nocardia cerradoensis* Infection in Humans, Spain, 2011 and 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 22(1), 109–111. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150771>
61. Escudero-Jimenez, A., Saez-Nieto, J. A., Turowicz, M., & Bartolome-Alvarez, J. (2015). Skin infection after infiltration by *Nocardia cerradoensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(5), 325-326.
62. Farfour, E., Leto, J., Barritault, M., Barberis, C., Meyer, J., Dauphin, B., Le Guern, A. S., Leflèche, A., Badell, E., Guiso, N., Leclercq, A., Le Monnier, A., Lecuit, M., Rodriguez-Nava, V., Bergeron, E., Raymond, J., Vimont, S., Bille, E., Carbonnelle, E., Guet-Revillet, H., & Join-Lambert, O. (2012). Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), 2702–2707. <https://doi.org/10.1128/JCM.00368-12>
63. Ferrecchia, C. E., Ducore, R. M., Colgin, L. M., & Lewis, A. D. (2015). Spontaneous nocardial brain abscess in a juvenile rhesus macaque (*Macaca mulatta*). *Journal of Medical Primatology*, 44(1), 45–48. <https://doi.org/10.1111/jmp.12153>
64. Gallegos, J. E., Hayrynen, S., Adames, N. R., & Peccoud, J. (2020). Challenges and opportunities for strain verification by whole-genome sequencing. *Scientific reports*, 10(1), 5873. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62364-6>
65. Gezuelle, E. 1972. Fatal infection by *Nocardia brasiliensis* in an armadillo. *Sabouraudia*. 10:63-65.
66. Girard, V., Mailler, S., Polsinelli, S., Jacob, D., Saccomani, M. C., Celliere, B., Monnin, V., van Belkum, A., Hagen, F., Meis, J. F., & Durand, G. (2017). Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(1), 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.024>

67. Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>
68. Glupczynski, Y., Berhin, C., Janssens, M., & Wauters, G. (2006). Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by Etest. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), 905–912. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01460.x>
69. Gnanam, H., Rajapandian, S., Gunasekaran, R., Roshni Prithiviraj, S., Ravindran, R. S., Sen, S., & Prajna, L. (2020). Molecular identification of *Nocardia* species causing endophthalmitis using multilocus sequence analysis (MLSA): a 10-year perspective. *Journal of Medical Microbiology*, 69(5), 728–738. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001180>
70. Gomez-Escribano, J. P., Alt, S., & Bibb, M. J. (2016). Next generation sequencing of Actinobacteria for the discovery of novel natural products. *Marine drugs*, 14(4), 78. <https://doi.org/10.3390/md14040078>
71. Goodfellow M, Maldonado LA. (2012). Genus *Nocardia* Trevisan 1889, p376 – 419. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, Whitman W (ed), *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed, vol 5. Springer, New York, NY
72. Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews. Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
73. Gordon, R. E., & Mihm, J. M. (1962). The type species of the genus *Nocardia*. *Journal of General Microbiology*, 27, 1–10. <https://doi.org/10.1099/00221287-27-1-1>
74. Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 1), 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
75. Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
76. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
77. Gutiérrez Dubois, J., Alonso Martínez, J. L., Alvarez Frías, M. T., Abínzano Guillén, M. L., Munuera García, L., & Solano Remírez, M. (2006). Nocardiosis pulmonar como causa de reagudizaciones en un paciente EPOC [Pulmonary nocardiosis due to reagudizations in a COPD patient]. *Anales de medicina interna (Madrid, Spain: 1984)*, 23(11), 537–539. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992006001100007>

78. Ha, S. M., Kim, C. K., Roh, J., Byun, J. H., Yang, S. J., Choi, S. B., Chun, J., & Yong, D. (2019). Application of the whole genome-based bacterial identification system, TrueBac ID, using clinical isolates that were not identified with three matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems. *Annals of Laboratory Medicine*, 39(6), 530–536. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.6.530>
79. Hamdi, A. M., Fida, M., Deml, S. M., Abu Saleh, O. M., & Wengenack, N. L. (2020). Retrospective analysis of antimicrobial susceptibility profiles of *Nocardia* species from a tertiary hospital and reference laboratory, 2011 to 2017. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3), e01868-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01868-19>
80. Hashemi-Shahraki, A., Heidarieh, P., Bostanabad, S. Z., Hashemzadeh, M., Feizabadi, M. M., Schraufnagel, D., & Mirsaedi, M. (2015). Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* species among patients with nocardiosis. *Scientific Reports*, 5, 17862. <https://doi.org/10.1038/srep17862>
81. Haussaire, D., Fournier, P. E., Djiguiba, K., Moal, V., Legris, T., Purgus, R., Bismuth, J., Elharrar, X., Reynaud-Gaubert, M., & Vacher-Coponat, H. (2017). Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004-2014. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 57, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.005>
82. Heep, M., Brandstätter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., & Niemann, S. (2001). Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 107–110. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.107-110.2001>
83. Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico [Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis]. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
84. Hoang, H. H., Wang, P. C., & Chen, S. C. (2020). Interleukin 34 serves as a novel molecular adjuvant against *Nocardia seriolae* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Vaccines*, 8(2), E151. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020151>
85. Holden, M. T., Hsu, L. Y., Kurt, K., Weinert, L. A., Mather, A. E., Harris, S. R., Strommenger, B., Layer, F., Witte, W., de Lencastre, H., Skov, R., Westh, H., Zemlicková, H., Coombs, G., Kearns, A. M., Hill, R. L., Edgeworth, J., Gould, I., Gant, V., Cooke, J., & Nübel, U. (2013). A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic. *Genome Research*, 23(4), 653–664. <https://doi.org/10.1101/gr.147710.112>
86. Hoshino, Y., Chiba, K., Ishino, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Yazawa, K., Mikami, Y., & Ishikawa, J. (2011). Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in *Nocardia farcinica*. *Journal of Bacteriology*, 193(2), 441–448. <https://doi.org/10.1128/JB.00897-10>

87. Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., & Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 404–414. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
88. Hsueh, P. R., Lee, T. F., Du, S. H., Teng, S. H., Liao, C. H., Sheng, W. H., & Teng, L. J. (2014). Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2371–2379. <https://doi.org/10.1128/JCM.00456-14>
89. Hu, J. Y., Li, L., Peng, G., Li, Y. Q., Xu, L. H., Guan, H. L., Zhao, L. X., & Miao, C. P. (2020). *Nocardia panacis* sp. nov., a novel actinomycete with antiphytopathogen activity isolated from the rhizosphere of *Panax notoginseng*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(2), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01326-z>
90. Huang, L., Chen, X., Xu, H., Sun, L., Li, C., Guo, W., Xiang, L., Luo, G., Cui, Y., & Lu, B. (2019). Clinical features, identification, antimicrobial resistance patterns of *Nocardia* species in China: 2009–2017. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.12.007>
91. Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11), 2465–2466.
92. Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Hoshino, Y., Kurita, H., Hotta, K., Shiba, T., & Hattori, M. (2004). The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14925–14930. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406410101>
93. Jang, K. S., & Kim, Y. H. (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 56(4), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7457-0>
94. Jannat-Khah, D., Kroppenstedt, R. M., Klenk, H. P., Spröer, C., Schumann, P., Lasker, B. A., Steigerwalt, A. G., Hinrikson, H. P., & Brown, J. M. (2010). *Nocardia mikamii* sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 10), 2272–2276. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015594-0>
95. Ji, X., Zhang, X., Li, H., Sun, L., Hou, X., Song, H., Han, L., Xu, S., Qiu, X., Wang, X., Zheng, N., & Li, Z. (2020). Nfa34810 Facilitates *Nocardia farcinica* invasion of host cells and stimulates tumor necrosis factor alpha secretion through activation of the NF- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways via toll-like receptor 4. *Infection and Immunity*, 88(4), e00831-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00831-19>
96. Kachuei, R., Emami, M., Mirnejad, R., & Khoobdel, M. (2012). Diversity and frequency of *Nocardia* spp. in the soil of Isfahan province, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 474–478. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60079-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60079-3)

97. Kandi V. (2015). Human *Nocardia* infections: a review of pulmonary nocardiosis. *Cureus*, 7(8), e304. <https://doi.org/10.7759/cureus.304>
98. Khot, P. D., Bird, B. A., Durrant, R. J., & Fisher, M. A. (2015). Identification of *Nocardia* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10), 3366–3369. <https://doi.org/10.1128/JCM.00780-15>
99. Kim, K. O., Shin, K. S., Kim, M. N., Shin, K. S., Labeda, D. P., Han, J. H., & Kim, S. B. (2012). Reassessment of the status of *Streptomyces setonii* and reclassification of *Streptomyces fimicarius* as a later synonym of *Streptomyces setonii* and *Streptomyces albovinaceus* as a later synonym of *Streptomyces globisporus* based on combined 16S rRNA/*gyrB* gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 12), 2978–2985. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.040287-0>
100. Kirby, B. M., Everest, G. J., & Meyers, P. R. (2010). Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97(2), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9393-9>
101. Komaki, H., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Takahashi-Nakaguchi, A., Matsuzawa, T., Suzuki, K., Fujita, N., & Gono, T. (2014). Genome based analysis of type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in seven strains of five representative *Nocardia* species. *BMC Genomics*, 15(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-323>
102. Kong, F., Wang, H., Zhang, E., Sintchenko, V., Xiao, M., Sorrell, T. C., Chen, X., & Chen, S. C. (2010). *secA1* gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 3928–3934. <https://doi.org/10.1128/JCM.01113-10>
103. Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6258–6264. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6258-6264.2005>
104. Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B. M., Peduzzi, R., & Demarta, A. (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 (12), 2743–2751. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.63650-0>
105. Lai, C. C., Liu, W. L., Ko, W. C., Chen, Y. H., Tang, H. J., Huang, Y. T., & Hsueh, P. R. (2011). Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, Taiwan, 1998–2009. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(6), 833–835. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq255>
106. Lara-Severino, R. D., Camacho-López, M. A., Casanova-González, E., Gómez-Oliv n, L. M., Sandoval-Trujillo,  . H., Isaac-Oliv , K., & Ramírez-Durán, N. (2016). Haloalkalitolerant Actinobacteria with capacity for anthracene degradation isolated from soils close to areas with oil activity in the State of Veracruz, Mexico. *International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 19(1), 15–26. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.259>

107. Larruskain, J., Idigoras, P., Marimón, J. M., & Pérez-Trallero, E. (2011). Susceptibility of 186 *Nocardia* sp. isolates to 20 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 2995–2998. <https://doi.org/10.1128/AAC.01279-10>
108. Laurent, F., A. Carlotti, P. Boiron, J. Villard & J. Freney. (1996). Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:1079–1082
109. Laurent, F., Poirel, L., Naas, T., Chaibi, E. B., Labia, R., Boiron, P., Nordmann, P. (1999). Biochemical-genetic analysis and distribution of FAR-1, a class A beta-lactamase from *Nocardia farcinica*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 43, 1644–1650. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1644>
110. Lebeaux, D., Bergeron, E., Berthet, J., Djadi-Prat, J., Mouni e, D., Boiron, P., Lortholary, O., & Rodriguez-Nava, V. (2019). Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010-2015. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(4), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.013>
111. Lebeaux, D., Freund, R., van Delden, C., Guillot, H., Marbus, S. D., Matignon, M., Van Wijngaerden, E., Douvry, B., De Greef, J., Vuotto, F., Tricot, L., Fern andez-Ruiz, M., Dantal, J., Hirzel, C., Jais, J. P., Rodriguez-Nava, V., Jacobs, F., Lortholary, O., Coussement, J., & European Study Group for *Nocardia* in Solid Organ Transplantation (2017). Outcome and treatment of nocardiosis after solid organ transplantation: new insights from a European study. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(10), 1396–1405. <https://doi.org/10.1093/cid/cix124>
112. Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S. C., & Chun, J. (2016). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1100–1103. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
113. Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
114. Loupal, V. G., Schonbauer, M. and Schonbauer-LangleA. (1982). Nocardiose bei einem Rotfruchs (*Vulpes vulpes*) und einem kleinen mungo (*Herpestes javanica*). *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 95:312-315.
115. Lu, S. H., Qian, Z. W., Mou, P. P., & Xie, L. (2020). Clinical *Nocardia* species: Identification, clinical characteristics, and antimicrobial susceptibility in Shandong, China. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 10.17305/bjbms.2020.4764. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4764>
116. Luo, Q., Hiessl, S., & Steinb uchel, A. (2014). Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. *Environmental Microbiology*, 16(1), 29–48. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12221>
117. Majeed, A., Beatty, N., Iftikhar, A., Mushtaq, A., Fisher, J., Gaynor, P., Kim, J. C., Marquez, J. L., Mora, F. E., Georgescu, A., & Zangeneh, T. (2018). A 20-year experience with nocardiosis in solid organ

- transplant (SOT) recipients in the Southwestern United States: A single-center study. *Transplant Infectious Disease: an official journal of the Transplantation Society*, 20(4), e12904. <https://doi.org/10.1111/tid.12904>
118. Margalit, I., Muhsen, K., Ben Ari, Y., Ben-Zvi, H., Shostak, Y., Krause, I., & Goldberg, E. (2020). *Nocardia* colonization in contrast to nocardiosis: a comparison of patients' clinical characteristics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(4), 759–763. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03796-5>
119. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., & Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
120. Matulionyte, R., Rohner, P., Uçkay, I., Lew, D., & Garbino, J. (2004). Secular trends of *Nocardia* infection over 15 years in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Pathology*, 57(8), 807–812. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.016923>
121. McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A. D., & Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
122. McNabb, A., Geddes, G., Shaw, C., Mithani, S., Isaac-Renton, J. (2006). Identification of *Nocardia* species by partial gene sequencing of the 16S rRNA genes: the sun sets on *Nocardia asteroides*. *Canadian Journal of Medical Laboratory Science* 68:18–33
123. McTaggart, L. R., Chen, Y., Poopalarajah, R., & Kus, J. V. (2018). Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 92(4), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.016>
124. Medlar, A. J., Törönen, P., & Holm, L. (2018). AAI-profiler: fast proteome-wide exploratory analysis reveals taxonomic identity, misclassification and contamination. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W479–W485. <https://doi.org/10.1093/nar/gky359>
125. Mehta, H. H., & Shamoo, Y. (2020). Pathogenic *Nocardia*: A diverse genus of emerging pathogens or just poorly recognized? *PLoS pathogens*, 16(3), e1008280. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008280>
126. Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, 10(1), 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
127. Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14, 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>

128. Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., & Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 2), 352–356. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.056994-0>
129. Minero, M. V., Marín, M., Cercenado, E., Rabadán, P. M., Bouza, E., & Muñoz, P. (2009). Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine*, 88(4), 250–261. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e3181afa1c8>
130. Mohanty, A., Meena, S., Kumar, S. P., Gupta, P. K., Kaistha, N., Gupta, P., Jha, M. K., & Rekha, S. (2020). Incidental finding of *Nocardia*: a case series from a tertiary care centre in Uttarakhand. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2020, 6874625. <https://doi.org/10.1155/2020/6874625>
131. Mukai, A., Fukai, T., Hoshino, Y., Yazawa, K., Harada, K., & Mikami, Y. (2009). Nocardithiocin, a novel thiopeptide antibiotic, produced by pathogenic *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757. *The Journal of antibiotics*, 62(11), 613–619. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.90>
132. Muricy, E. C., Lemes, R. A., Bombarda, S., Ferrazoli, L., & Chimara, E. (2014). Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(5), 397–401. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000500005>
133. Murray, P., Rosenthal, K. S., Pfaller M. A. (2017). *Microbiología Médica*. Elsevier Mosby, Elsevier España, S.A. Génova 17, 3° ISBN 978-84-8174-927-4.
134. Netzker, T., Flak, M., Krespach, M. K., Stroe, M. C., Weber, J., Schroeckh, V., & Brakhage, A. A. (2018). Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.002>
135. Nguyen, N. M., Sink, J. R., Carter, A. J., & Asrani, F. (2017). Nocardiosis incognito: Primary cutaneous nocardiosis with extension to myositis and pleural infection. *JAAD case reports*, 4(1), 33–35. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2017.08.010>
136. Nishida, M., Mine, Y., Nonoyama, S., & Kojo, H. (1977). Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic III. *In vitro* evaluation. *The Journal of Antibiotics*, 30(11), 917–925. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.917>
137. Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H. P., Goodfellow, M., & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2007. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
138. Nyrén, P., & Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 504–509. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90211-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90211-8)
139. Ott, S. R., Meier, N., Kolditz, M., Bauer, T. T., Rohde, G., Presterl, E., Schürmann, D., Lepper, P. M., Ringshausen, F. C., Flick, H., Leib, S. L., Pletz, M. W., & OPINION Study Group (2019). Pulmonary nocardiosis in Western Europe-Clinical evaluation of 43 patients and population-based estimates of

- hospitalization rates. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 81, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.12.010>
140. Paige, E. K., & Spelman, D. (2019). Nocardiosis: 7-year experience at an Australian tertiary hospital. *Internal Medicine Journal*, 49(3), 373–379. <https://doi.org/10.1111/imj.14068>
141. Patel, H., Patel, B., Jadeja, S., & Isache, C. (2019). Central nervous system nocardiosis masquerading as metastatic brain lesions. *IDCases*, 18, e00652. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00652>
142. Perçin, D., Sümerkan, B., & Inci, R. (2011). *Nocardia* Klinik İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde E-Test ve Disk Difüzyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması [Comparative evaluation of e-test and disk diffusion methods for susceptibility testing of *Nocardia* species]. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 45(2), 274–279.
143. Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
144. Petti, C. A., Bosshard, P. P., Brandt M. E., Clarridge J. E., Feldbyum, T.V. Foxall, P., Furtado, M. R., Pace, N. Procop, G., (2008) Interpretative criteria for identification of bacteria and fungus by DNA target sequencing; approved guidelines MM-18A. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
145. Piau, C., Kerjoun, M., Le Mouel, M., Patrat-Delon, S., Henaux, P. L., Brun, V., Morin, M. P., Gautier, P., Rodriguez-Nava, V., & Kayal, S. (2015). First case of disseminated infection with *Nocardia cerraadoensis* in a human. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 1034–1037. <https://doi.org/10.1128/JCM.02979-14>
146. Poirel, L., Laurent, F., Naas, T., Labia, R., Boiron, P., & Nordmann, P. (2001). Molecular and biochemical analysis of AST-1, a class A beta-lactamase from *Nocardia asteroides sensu stricto*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 878–882. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.878-882.2001>
147. Rahdar, H. A., Azadi, D., Shojaei, H., & Daei-Naser, A. (2017). Molecular analysis and species diversity of *Nocardia* in the hospital environment in a developing country, a potential health hazard. *Journal of Medical Microbiology*, 66(3), 334–341. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000436>
148. Ramirez, M. S., Nikolaidis, N., & Tolmasky, M. E. (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac (6)-Ib paradigm. *Frontiers in Microbiology*, 4, 121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121>
149. Rawat, D., Rajasurya, V., Chakraborty, R. K., & Sharma, S. (2020). Nocardiosis. In StatPearls. StatPearls Publishing.
150. Reddy, A. K., Garg, P., & Kaur, I. (2010). Speciation and susceptibility of *Nocardia* isolated from ocular infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(8), 1168–1171. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03079.x>
151. Ribeiro, M. G., Salerno, T., Mattos-Guaraldi, A. L., Camello, T. C., Langoni, H., Siqueira, A. K., Paes, A. C., Fernandes, M. C., & Lara, G. H. (2008). Nocardiosis: an overview and additional report of 28

- cases in cattle and dogs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 50(3), 177–185. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652008005000004>
152. Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 19126–19131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
153. Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
154. Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica [Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>
155. Rodrigues, E. M., Vidigal, P., Pylro, V. S., Morais, D. K., Leite, L. R., Roesch, L., & Tótoia, M. R. (2017). Draft genome of *Nocardia farcinica* TRH1, a linear and polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from the coast of Trindade Island, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology*, 48(3), 391–392. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.014>
156. Rodríguez-Lozano, J., Armiñanzas Castillo, C., Ruiz de Alegría Puig, C., Ventosa Ayarza, J. A., Fariñas, M. C., Agüero, J., & Calvo, J. (2019). Post-traumatic endophthalmitis caused by *Nocardia nova*. *JMM case reports*, 6(2), e005175. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005175>
157. Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Devulder, G., Flandrois, J. P., Boiron, P., & Laurent, F. (2006). Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* gene-based identification of *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), 536–546. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.536-546.2006>
158. Rodríguez-Nava, V., Durupt, S., Chyderiotis, S., Freydière, A. M., Karsenty, J., de Montclos, M., Reix, P., Durieu, I., Nove-Josserand, R., Chiron, R., Bremont, F., Têtu, L., Murriss, M., Terru, D., Godreuil, S., Bergeron, E., Frenay, J., Boiron, P., Vandenesch, F., Marchandin, H., & Doléans-Jordheim, A. (2015). A French multicentric study and review of pulmonary *Nocardia* spp. in cystic fibrosis patients. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(4), 493–504. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0360-3>
159. Rodríguez-Nava, V., Khan, Z. U., Pötter, G., Kroppenstedt, R. M., Boiron, P., & Laurent, F. (2007). *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 7), 1482–1486. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64815-0>
160. Rodríguez-R, L. M., & Konstantinidis, K. T. (2014). Bypassing cultivation to identify bacterial species. *Microbe*, 9(3), 111–118.
161. Rodríguez-R, L. M., Gunturu, S., Harvey, W. T., Rosselló-Mora, R., Tiedje, J. M., Cole, J. R., & Konstantinidis, K. T. (2018). The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W282–W288. <https://doi.org/10.1093/nar/gky467>

162. Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.001>
163. Rosselló-Móra, R., & Whitman, W. B. (2019). Dialogue on the nomenclature and classification of prokaryotes. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.07.002>
164. Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R. M., Harmsen, D., & Mauch, H. (2003). Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxons. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 851–856. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.2.851-856.2003>
165. Rouzaud, C., Rodriguez-Nava, V., Catherinot, E., Méchaï, F., Bergeron, E., Farfour, E., Scemla, A., Poirée, S., Delavaud, C., Mathieu, D., Durupt, S., Larosa, F., Lengelé, J. P., Christophe, J. L., Suarez, F., Lortholary, O., & Lebeaux, D. (2018). Clinical assessment of a *Nocardia* PCR-based assay for diagnosis of nocardiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(6), e00002-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00002-18>
166. Salam, N., Jiao, J. Y., Zhang, X. T., & Li, W. J. (2020). Update on the classification of higher ranks in the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), 1331–1355. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003920>
167. Schlaberg, R., Fisher, M. A., & Hanson, K. E. (2014). Susceptibility profiles of *Nocardia* isolates based on current taxonomy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 795–800. <https://doi.org/10.1128/AAC.01531-13>
168. Schneider, K., Rose, I., Vikineswary, S., Jones, A. L., Goodfellow, M., Nicholson, G., & Fiedler, H. P. (2007). Nocardichelins A and B, siderophores from *Nocardia strain acta 3026*. *Journal of natural products*, 70(6), 932-935. (6). <https://doi.org/10.1021/np060612i>
169. Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
170. Segawa, S., Nishimura, M., Sogawa, K., Tsuchida, S., Murata, S., Watanabe, M., Matsushita, K., Kamei, K., & Nomura, F. (2015). Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Proteomics*, 12(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12014-015-9078-5>
171. Silva, M., Machado, M. P., Silva, D. N., Rossi, M., Moran-Gilad, J., Santos, S., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2018). chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microbial Genomics*, 4(3), e000166. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000166>
172. Sohng, J. K., Yamaguchi, T., Seong, C. N., Baik, K. S., Park, S. C., Lee, H. J., Jang, S. Y., Simkhada, J. R., & Yoo, J. C. (2008). Production, isolation and biological activity of nargenicin from *Nocardia* sp. CS682. *Archives of Pharmacal Research*, 31(10), 1339–1345. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-2115-0>
173. Soto, E., Arauz, M., Gallagher, C. A., & Illanes, O. (2014). *Nocardia cyriacigeorgica* as the causative agent of mandibular osteomyelitis (lumpy jaw) in a cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation:*

- official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 26(4), 580–584. <https://doi.org/10.1177/1040638714533117>
174. Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
175. Steinbrink, J., Leavens, J., Kauffman, C. A., & Miceli, M. H. (2018). Manifestations and outcomes of *Nocardia* infections: Comparison of immunocompromised and nonimmunocompromised adult patients. *Medicine*, 97(40), e12436. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012436>
176. Sueoka, E., Nishiwaki, S., Okabe, S., Iida, N., Suganuma, M., Yano, I., Aoki, K., & Fujiki, H. (1995). Activation of protein kinase C by mycobacterial cord factor, trehalose 6-monomycolate, resulting in tumor necrosis factor-alpha release in mouse lung tissues. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 86(8), 749–755. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1995.tb02464.x>
177. Takeda, K., Kang, Y., Yazawa, K., Gonoi, T., & Mikami, Y. (2010). Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 2), 165–171. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.011346-0>
178. Tamura, T., Matsuzawa, T., Oji, S., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Katsumata, H., Yamazoe, A., Hamada, M., Suzuki, K., Gonoi, T., & Fujita, N. (2012). A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(3), 481–491. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9780-5>
179. Tamura, T., Ohji, S., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Hamada, M., Komaki, H., Shibata, C., Matsuzawa, T., Gonoi, T., Suzuki, K. I., & Fujita, N. (2018). Reclassification of *Nocardia* species based on whole genome sequence and associated phenotypic data. *The Journal of Antibiotics*, 71(7), 633–641. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0043-1>
180. Tan, Y. E., Chen, S. C., & Halliday, C. L. (2020). Antimicrobial susceptibility profiles and species distribution of medically relevant *Nocardia* species: Results from a large tertiary laboratory in Australia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.018>
181. Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., & Grimont, P. A. (2008). Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology*, 159(3), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.005>
182. Thawai, C., Rungjindamai, N., Klanbut, K., & Tanasupawat, S. (2017). *Nocardia xestospongiae* sp. nov., isolated from a marine sponge in the Andaman Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1451–1456. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001736>
183. Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics*, 14, 913. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-913>

184. Thompson, C. C., Vicente, A. C., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T., Vesth, T., Alves, N., Jr, Ussery, D. W., Iida, T., & Thompson, F. L. (2009). Genomic taxonomy of *Vibrios*. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-258>
185. Toyokawa, M., Kimura, K., Nishi, I., Sunada, A., Ueda, A., Sakata, T., & Asari, S. (2013). Reliable and reproducible method for rapid identification of *Nocardia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rinsho Biseibutsu Jinsoku Shindan Kenkyukai shi = JARMAM : Journal of the Association for Rapid Method and Automation in Microbiology*, 24(1), 1–8. PMID: 24800394.
186. Tremblay, J., Thibert, L., Alarie, I., Valiquette, L., & Pépin, J. (2011). Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(5), 690–696. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03306.x>
187. Tsukamura M. (1969). Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. *Journal of general microbiology*, 56(3), 265–287. <https://doi.org/10.1099/00221287-56-3-265>
188. Uhde, K. B., Pathak, S., McCullum, I., Jr, Jannat-Khah, D. P., Shadomy, S. V., Dykewicz, C. A., Clark, T. A., Smith, T. L., & Brown, J. M. (2010). Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, United States, 1995-2004. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(12), 1445–1448. <https://doi.org/10.1086/657399>
189. Uhde, A. K., Kilwinski, J., Peters, M., Verspohl, J., Feßler, A. T., Schwarz, S., & Wohlsein, P. (2016). Fatal nocardiosis in a dog caused by multiresistant *Nocardia veterana*. *Veterinary Microbiology*, 183, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.001>
190. Valdezate Ramos, S., Monzón Fernández, S., Garrido Castrillo N., Carrasco Díaz, G., Zaballos Sanz A., Cuesta De La Plaza. I. Resistencia intrínseca a Fluoroquinolonas en *Nocardia* spp.: estudio de las QRDRs de GyrA/GyrB. XXIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid, del 23 al 25 de mayo de 2019
191. Valdezate, S., Garrido, N., Carrasco, G., Medina-Pascual, M. J., Villalón, P., Navarro, A. M., & Saéz-Nieto, J. A. (2017). Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(3), 754–761. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw489>
192. Valdezate, S., Garrido, N., Carrasco, G., Villalón, P., Medina-Pascual, M. J., & Saéz-Nieto, J. A. (2015). Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. *Frontiers in Microbiology*, 6, 376. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00376>
193. Valero-Guillén, P. L., & Martín-Luengo, F. (1984). *Nocardia* in soils of southeastern Spain: abundance, distribution, and chemical characterisation. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(8), 1088-1092.
194. Vallenet, D., Calteau, A., Cruveiller, S., Gachet, M., Lajus, A., Josso, A., Mercier, J., Renaux, A., Rollin, J., Rouy, Z., Roche, D., Scarpelli, C., & Médigue, C. (2017). MicroScope in 2017: an expanding and

- evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D517–D528. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1101>
195. Varghese, N. J., Mukherjee, S., Ivanova, N., Konstantinidis, K. T., Mavrommatis, K., Kyrpides, N. C., & Pati, A. (2015). Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6761–6771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv657>
196. Vautrin, F., Bergeron, E., Dubost, A., Abrouk, D., Martin, C., Cournoyer, B., Louzier, V., Winiarski, T., Rodriguez-Nava, V., & Pujic, P. (2019). Genome sequences of three *Nocardia cyriacigeorgica* strains and one *Nocardia asteroides* strain. *Microbiology Resource Announcements*, 8(33), e00600-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00600-19>
197. Vera-Cabrera, L., Ortiz-Lopez, R., Elizondo-Gonzalez, R., & Ocampo-Candiani, J. (2013). Complete genome sequence analysis of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 reveals a saprobic lifestyle and the genes needed for human pathogenesis. *PloS One*, 8(6), e65425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065425>
198. Vera-Cabrera, L., Ortiz-Lopez, R., Elizondo-Gonzalez, R., Perez-Maya, A. A., & Ocampo-Candiani, J. (2012). Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *Journal of Bacteriology*, 194(10), 2761–2762. <https://doi.org/10.1128/JB.00210-12>
199. Verroken, A., Janssens, M., Berhin, C., Bogaerts, P., Huang, T. D., Wauters, G., & Glupczynski, Y. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 4015–4021. <https://doi.org/10.1128/JCM.01234-10>
200. Vrontou, E., & Economou, A. (2004). Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochimica et biophysica acta*, 1694(1-3), 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.06.003>
201. Wadhwa, T., Baveja, U., Kumar, N., Govil, D., & Sengupta, S. (2017). Clinical manifestations of nocardiosis: Study of risk factors and outcomes in a tertiary care hospital. *Journal of Laboratory Physicians*, 9(4), 288–295. https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_111_16
202. Wallace, R. J., Jr, Septimus, E. J., Musher, D. M., & Martin, R. R. (1977). Disk diffusion susceptibility testing of *Nocardia* species. *The Journal of Infectious Diseases*, 135(4), 568–576. <https://doi.org/10.1093/infdis/135.4.568>
203. Wang, W., Chen, J., Liao, B., Xia, L., Hou, S., Wang, Z., & Lu, Y. (2019). Identification and functional characterization of Histone-like DNA-binding protein in *Nocardia seriolae* (NsHLP) involved in cell apoptosis. *Journal of Fish Diseases*, 42(5), 657–666. <https://doi.org/10.1111/jfd.12962>
204. Wauters, G., Avesani, V., Charlier, J., Janssens, M., Vaneechoutte, M., & Delmée, M. (2005). Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2624–2628. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2624-2628.2005>
205. Weber, C. F., & Werth, J. T. (2015). Is the lower atmosphere a readily accessible reservoir of culturable, antimicrobial compound-producing Actinomycetales? *Frontiers in Microbiology*, 6, 802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00802>

206. Wei, M., Wang, P., Yang, C., & Gu, L. (2019). Molecular identification and phylogenetic relationships of clinical *Nocardia* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(12), 1755–1766. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01296-2>
207. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
208. Welsh, O., Vera-Cabrera, L., & Salinas-Carmona, M. C. (2013). Current treatment for *Nocardia* infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(17), 2387–2398. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.842553>
209. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
210. Wigney, D. I., Gee, D. R., & Canfield, P. J. (1989). Pyogranulomatous pneumonias due to *Nocardia asteroides* and *Staphylococcus epidermidis* in two koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 25(4), 592–596. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-25.4.592>
211. Williams, E., Jenney, A. W., & Spelman, D. W. (2020). *Nocardia* bacteremia: A single-center retrospective review and a systematic review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 92, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.011>
212. Wilson J. W. (2012). Nocardiosis: updates and clinical overview. *Mayo Clinic proceedings*, 87(4), 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.11.016>
213. Wu, G., Nie, L., & Zhang, W. (2006). Predicted highly expressed genes in *Nocardia farcinica* and the implication for its primary metabolism and nocardial virulence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89(1), 135–146. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9016-z>
214. Xavier, B. B., Mysara, M., Bolzan, M., Ribeiro-Gonçalves, B., Alako, B., Harrison, P., Lammens, C., Kumar-Singh, S., Goossens, H., Carriço, J. A., Cochrane, G., & Malhotra-Kumar, S. (2020). BacPipe: a rapid, user-friendly whole-genome sequencing pipeline for clinical diagnostic bacteriology. *iScience*, 23(1), 100769. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.100769>
215. Xiao, M., Pang, L., Chen, S. C., Fan, X., Zhang, L., Li, H. X., Hou, X., Cheng, J. W., Kong, F., Zhao, Y. P., & Xu, Y. C. (2016). Accurate identification of common pathogenic *Nocardia* species: evaluation of a multilocus sequence analysis platform and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PloS One*, 11(1), e0147487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147487>
216. Yamamura, H., Hayakawa, M., Nakagawa, Y., & Iimura, Y. (2004). Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3149–3151. <https://doi.org/10.1128/aem.70.5.3149-3151.2004>

217. Yang, R. Q., Zhang, B. L., Sun, H. L., Zhang, G. S., Li, S. W., Liu, G. X., Chen, T., Li, Y. S., Wu, Y. N., An, L. Z., Zhang, W., & Wu, X. K. (2019). *Nocardia mangyaensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from crude-oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(2), 397–403. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003159>
218. Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
219. Yasuike, M., Nishiki, I., Iwasaki, Y., Nakamura, Y., Fujiwara, A., Shimahara, Y., Kamaishi, T., Yoshida, T., Nagai, S., Kobayashi, T., & Katoh, M. (2017). Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: The first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species. *PloS One*, 12(3), e0173198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173198>
220. Yi, M., Wang, L., Xu, W., Sheng, L., Jiang, L., Yang, F., Cao, Q., & Wu, J. (2019). Species distribution and antibiotic susceptibility of *Nocardia* isolates from Yantai, China. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3653–3661. <https://doi.org/10.2147/IDR.S232098>
221. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
222. Yoshimura, D., Kajitani, R., Gotoh, Y., Katahira, K., Okuno, M., Ogura, Y., Hayashi, T., & Itoh, T. (2019). Evaluation of SNP calling methods for closely related bacterial isolates and a novel high-accuracy pipeline: BactSNP. *Microbial Genomics*, 5(5), e000261. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000261>
223. Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
224. Zhang, J. X., Ming, H., Zhao, Z. L., Ji, W. L., Chang, X. L., Zhang, L. Y., Cheng, L. J., Meng, X. L., Li, W. J., & Nie, G. X. (2019). *Nocardia yunnanensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a soil sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(10), 3116–3120. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003600>
225. Zhang, W., Du, P., Zheng, H., Yu, W., Wan, L., & Chen, C. (2014). Whole-genome sequence comparison as a method for improving bacterial species definition. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(2), 75–78. <https://doi.org/10.2323/jgam.60.75>
226. Zhao, J., Han, X., Hu, H., Ling, L., Zhang, X., Guo, X., Wang, X., & Xiang, W. (2020). *Nocardia stercoris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the cow dung. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 493–498. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003784>
227. Zhou, T., Wang, X. Y., Deng, D. Q., Xu, L. H., Li, X. L., Guo, Y., Li, W. H., Xie, H., Zhang, P. L., & Zhou, X. H. (2020). *Nocardia colli* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with primary cutaneous

nocardiosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 2981–2987. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003856>

228. Zoni Matta A.C., Martínez López, J. Eficacia de la secuenciación masiva para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades oncohematológicas. Madrid. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Unidad de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de la Comunidad de Madrid. 2015. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

229. Zoropogui, A., Pujic, P., Normand, P., Barbe, V., Belli, P., Graindorge, A., Roche, D., Vallenet, D., Mangenot, S., Boiron, P., Rodriguez-Nava, V., Ribun, S., Richard, Y., Cournoyer, B., & Blaha, D. (2013). The *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 genome shows ongoing adaptation of an environmental Actinobacteria to a pathogen's lifestyle. *BMC Genomics*, 14, 286. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-286>

ANEXOS



ANEXO I: Primodescripción de las 54 especies de *Nocardia* spp. clínicamente más relevantes.

Espece	Año de descripción	Publicación primera descripción de caso clínico
<i>N. abscessus</i>	2000	Yassin (A.F.), Rainey (F.A.), Mendrock (U.), Brzezinka (H.) And Schaal (K.P.): <i>Nocardia abscessus</i> sp. nov. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2000, 50 , 1487-1493.
<i>N. africana</i>	2001	Hamid (M.E.), Maldonado (L.), Sharaf Eldin (G.S.), Mohamed (M.F.), Saeed (N.S.) And Goodfellow (M.): <i>Nocardia africana</i> sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2001, 39 , 625-630.
<i>N. amamiensis</i>	2007	Yamamura (H.), Tamura (T.), Sakiyama (Y.) And Harayama (S.): <i>Nocardia amamiensis</i> sp. nov., isolated from a sugar-cane field in Japan. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2007, 57 , 1599-1602
<i>N. amikacinotolerans</i>	2013	Ezeoke (I.), Klenk (H.P.), Pötter (G.), Schumann (P.), Moser (B.D.), Lasker (B.A.), Nicholson (A.) And Brown (J.M.): <i>Nocardia amikacinotolerans</i> sp. nov., an amikacin-resistant human pathogen. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2013, 63 , 1056-1061.
<i>N. anaemiae</i>	2005	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Nishimura (K.) And Mikami (Y.): <i>Nocardia anaemiae</i> sp. nov. isolated from an immunocompromised patient and the first isolation report of <i>Nocardia vinacea</i> from humans. <i>Jpn. J. Med. Mycol.</i> , 2005, 46 , 21-26.
<i>N. aobensis</i>	2005	Kageyama (A.), Suzuki (S.), Yazawa (K.), Nishimura (K.), Kroppenstedt (R.M.) and MIKAMI (Y.): <i>Nocardia aobensis</i> sp. nov., isolated from patients in Japan. <i>Microbiol. Immunol.</i> , 2004, 48 , 817-822.
<i>N. araoensis</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Mukai (A.), Kohara (T.), Nishimura (K.), Kroppenstedt (R.M.) And Mikami (Y.): <i>Nocardia araoensis</i> sp. nov. and <i>Nocardia pneumoniae</i> sp. nov., isolated from patients in Japan. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 2025-2029.
<i>N. arthritidis</i>	2004	Kageyama (A.), Torikoe (K.), Iwamoto (M.), Masuyama (J.I.), Shibuya (Y.), Okazaki (H.), Yazawa (K.), Minota (S.), Kroppenstedt (R.M.) And Mikami (Y.): <i>Nocardia arthritidis</i> sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2004, 42 , 2366-2371.
<i>N. arizonensis</i>	2015	Lasker (B.A.), Bell (M), Klenk (H.P.), Schumann (P), Brown (J.M). <i>Nocardia arizonensis</i> sp. nov., obtained from human respiratory specimens. <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> . 2015., 108 :1129-37.

Especie	Año de descripción	Publicación primera descripción de caso clínico
<i>N. asiatica</i>	2004	Kageyama (A.), Poonwan (N.), Yazawa (K.), Mikami (Y.) and Nishimura (K.): <i>Nocardia asiatica</i> sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 125-130.
<i>N. asteroides</i>	1891	- Eppinger (H.): Über eine neue pathogene <i>Cladothrix</i> und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (<i>Cladothrichica</i>). <i>Beitrage zur pathologischen Anatomie</i> , 1891, 9 , 287-328. - Blanchard (R.): Parasites végétaux à l'exclusion des bactéries. In: C. BOUCHARD (éd.), <i>Traité de Pathologie Générale</i> , Vol. 2, G. Masson, Paris, 1896, pp. 1-932.
<i>N. beijingensis</i>	2001	Wang (L.), Zhang (Y.), Lu (Z.), Shi (Y.), Liu (Z.), Maldonado (L.) and GOODFELLOW (M.): <i>Nocardia beijingensis</i> sp. nov., a novel isolate from soil. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2001, 51 , 1783-1788.
<i>N. blacklockiae</i>	2008	Conville (P.S.), Brown (J.M.), Steigerwalt (A.G.), Brown-Elliott (B.A.) and Witebsky (F.G.): <i>Nocardia wallacei</i> , sp. nov., and <i>Nocardia blacklockiae</i> , sp. nov., human pathogens and members of the " <i>Nocardia transvalensis</i> complex". <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2008, 46 , 1178-1184.
<i>N. boironii</i>	2016	Gilquin (J.M), Riviere (B), Jurado (V), Audouy (B), Kouatche (J.B), Bergeron (E), Mounié (D), Molina (T), Faure (P), Saiz-Jimenez (C), Rodríguez-Nava (V). First Case Of Actinomycetoma In France Due to a Novel <i>Nocardia</i> Species, <i>Nocardia boironii</i> sp. nov. <i>mSphere</i> , 2016,23,1-6.
<i>N. brasiliensis</i>	1909	Lindenberg (A.): Un nouveau mycétome. <i>Archives de Parasitologie</i> , 1909, 13 , 265-282. 2 PINOY (E.): Actinomycoses et mycétomes. <i>Bulletin de l'Institut Pasteur</i> , 1913, 11 , 929-938.
<i>N. brevicatena</i>	1961	Goodfellow (M.) and Pirouz (T.): Numerical classification of sporoactinomyces containing <i>meso</i> -diaminopimelic acid in the cell wall. <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 1982, 128 , 503-527.
<i>N. carnea</i>	1891	Rossi Doria (T.): Su di alcune specie di "Streptohrix" trovate nell'aria studiate in rapporto a quelle già note a specialmente all' "Actinomyces". <i>Annali dell'Istituto d'Igiene Sperimentale, Università a Roma</i> , 1891, 1 , 399-438. 2 CASTELLANI (A.) and Chalmers (A.J.) (editors): <i>Manual of Tropical Medicine</i> , 2 nd ed., Bailliere, Tindall and Cox, London, 1913, pp. 1-1719.
<i>N. cerradoensis</i>	2003	Albuquerque De Barros (E.V.S.), Manfio (G.P.), Ribeiro Maitan (V.), Mendes Bataus (L.A.), Kim (S.B.), Maldonado (L.A.) and Goodfellow (M.): <i>Nocardia cerradoensis</i> sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2003, 53 , 29-33.

Especie	Año de descripción	Publicación primera descripción de caso clínico
<i>N. concava</i>	2005	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Taniguchi (H.), Chibana (H.), Nishimura (K.), Kroppenstedt (R.M.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia concava</i> sp. nov., isolated from Japanese patients. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2005, 55 , 2081-2083.
<i>N. cyriacigeorgica</i>	2001 b	Yassin (A.F.), Rainey (F.A.) and Steiner (U.): <i>Nocardia cyriacigeorgici</i> sp. nov. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2001, 51 , 1419-1423.
<i>N. donostiensis</i>	2016	Ercibengoa (M.), Bell (M.), Marimón (J. M.), Humrighouse (B.), Klenk (H. P.), Pötter (G.), and Pérez-Trallero (E). <i>Nocardia donostiensis</i> sp. nov., isolated from human respiratory specimens. 2016. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 109 , 653–660.
<i>N. elegans</i>	2005	Yassin (A.F.) and Brenner (S.): <i>Nocardia elegans</i> sp. nov., a member of the <i>Nocardia vacciniiclade</i> isolated from sputum. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2005, 55 , 1505-1509.
<i>N. exalbida</i>	2006	Iida (S.), Kageyama (A.), Yazawa (K.), Uchiyama (N.), Toyohara (T.), Chohnabayashi (N.), Suzuki (S.), Nomura (F.), Kroppenstedt (R.M.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia exalbida</i> sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2006, 56 , 1193-1196.
<i>N. farcinica</i>	1889	Trevisan (V.): I. Generi E Le Specie Delle Batteriacee, Zanaboni and Gabuzzi, Milano, 1889
<i>N. harenae</i>	2006	Seo (J.P.) and Lee (S.D.): <i>Nocardia harenae</i> sp. nov., an actinomycete isolated from beach sand. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2006, 56 , 2203-2207.
<i>N. higoensis</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Mukai (A.), Kinoshita (M.), Takata (N.), Nishimura (K.), Kroppenstedt (R.M.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia shimofusensis</i> sp. nov., isolated from soil, and <i>Nocardia higoensis</i> sp. nov., isolated from a patient with lung nocardiosis in Japan. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 1927-1931.
<i>N. ignorata</i>	2001	Yassin (A.F.), Rainey (F.A.) and Steiner (U.): <i>Nocardia ignorata</i> sp. nov. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> 2001, 51 , 2127-2131.
<i>N. inohanensis</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Nishimura (K.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia inohanensis</i> sp. nov., <i>Nocardia yamanashiensis</i> sp. nov. and <i>Nocardia niigatensis</i> sp. nov., isolated from clinical specimens. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 563-569.
<i>N. jinanensis</i>	2009	Sun (W.), Zhang (Y.Q.), Huang (Y.), Zhang (Y.Q.), Yang (Z.Y.) and Liu (Z.H.): <i>Nocardia jinanensis</i> sp. nov., an amicoumacin B-producing actinomycete. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2009, 59 , 417-420.

Especie	Año de descripción	Publicación primera descripción de caso clínico
<i>N. kroppenstedtii</i>	2014	Jones, A. L., Fisher, A. J., Mahida, R., Gould, K., Perry, J. D., Hannan, M. M., Judge, E. P., Brown, R., Boagey, K. and Goodfellow, M. 2014. <i>Nocardia kroppenstedtii</i> sp. nov., an actinomycete isolated from a lung transplant patient with a pulmonary infection. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 64 , 751-754.
<i>N. kruczakiae</i>	2004	Conville (P.S.), Brown (J.M.), Steigerwalt (A.G.), Lee (J.W.), Anderson (V.L.), Fishbain (J.T.), Holland (S.M.) and Witebsky (F.G.): <i>Nocardia kruczakiae</i> sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the " <i>N. nova</i> complex". <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2004, 42 , 5139-5145.
<i>N. mexicana</i>	2006	Rodríguez-Nava (V.), Couble (A.), Molinard (C.), Sandoval (H.), Boiron (P.) and Laurent (F.): <i>Nocardia mexicana</i> sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2004, 42 , 4530-4535.
<i>N. mikamii</i>	2010	Jannat-Khah (D.), Kroppenstedt (R.M.), Klenk (H.P.), Spröer (C.), Schumann (P.), Lasker (B.A.), Steigerwalt (A.G.), Hinrikson (H.P.) and Brown (J.M.): <i>Nocardia mikamii</i> sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2010, 60 , 2272-2276.
<i>N. neocaledoniensis</i>	2004	Saintpierre-Bonaccio (D.), Maldonado (L.A.), Amir (H.), Pineau (R.) and Goodfellow (M.): <i>Nocardia neocaledoniensis</i> sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 599-603.
<i>N. niigatensis</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Nishimura (K.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia inohanensis</i> sp. nov., <i>Nocardia yamanashiensis</i> sp. nov. and <i>Nocardia niigatensis</i> sp. nov., isolated from clinical specimens. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 563-569.
<i>N. ninae</i>	2007	Laurent (F.), Rodríguez-Nava (V.), Noussair (L.), Couble (A.), Nicolas-Chanoine (M.H.) and Boiron (P.): <i>Nocardia ninae</i> sp. nov., isolated from a bronchial aspirate. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2007, 57 , 661-665.
<i>N. niwae</i>	2011	Moser (B.D.), Klenk (H.P.), Schumann (P.), Pötter (G.), Lasker (B.A.), Steigerwalt (A.G.), Hinrikson (H.P.) and Brown (J.M.): <i>Nocardia niwae</i> sp. nov., isolated from human pulmonary sources. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2011, 61 , 438-442.
<i>N. nova</i>	1982	Tsukamura (M.): Numerical analysis of the taxonomy of nocardiae and rhodococci. Division of <i>Nocardia asteroides</i> sensu stricto into two species and descriptions of <i>Nocardia paratuberculosis</i> sp. nov. Tsukamura (formerly the Kyoto-I group of Tsukamura), <i>Nocardia nova</i> sp. nov. Tsukamura, <i>Rhodococcus aichiensis</i> sp. nov., Tsukamura, <i>Rhodococcus chubuensis</i> sp. nov., Tsukamura, and <i>Rhodococcus obuensis</i> sp. nov., Tsukamura. <i>Microbiol. Immunol.</i> , 1982, 26 , 1101-1119.

Especie	Año de descripción	Publicación primera descripción de caso clínico
<i>N. otitidiscaviarum</i>	1924	Snijders (E.P.): Cavia-scheefkopperij, een nocardiose. <i>Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie</i> , 1924, 64 , 85-87.
<i>N. paucivorans</i>	2000	Yassin (A.F.), Rainey (F.A.), Burghardt (J.), Brzezinka (H.), Mauch (M.) and Schaal (K.P.): <i>Nocardia paucivorans</i> sp. nov. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2000, 50 , 803-809.
<i>N. pneumoniae</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Mukai (A.), Kohara (T.), Nishimura (K.), Kroppenstedt (R.M.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia araoensis</i> sp. nov. and <i>Nocardia pneumoniae</i> sp. nov., isolated from patients in Japan. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 2025-2029.
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	1995	Ruimy (R.), Riegel (P.), Carlotti (A.), Boiron (P.), Bernardin (G.), Monteil (H.), Wallace Jr. (R.J.) and Christen (R.): <i>Nocardia pseudobrasiliensis</i> sp. nov., a new species of nocardia which groups bacterial strains previously identified as <i>Nocardia brasiliensis</i> and associated with invasive diseases. <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 1996, 46 , 259-264.
<i>N. puris</i>	2003	Yassin (A.F.), Sträubler (B.), Schumann (P.) and Schaal (K.P.): <i>Nocardia puris</i> sp. nov. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2003, 53 , 1595-1599.
<i>N. shinanonensis</i>	2016	Matsumoto (T.), Negishi (T.), Hamada (M.), Komaki (H.), Gonoï, (T.) and Yaguchi (T.). 2016. <i>Nocardia shinanonensis</i> sp. nov., isolated from a patient with endophthalmitis. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 66 , 3324-3328.
<i>N. sienata</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Nishimura (K.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia testaceus</i> sp. nov. and <i>Nocardia senatus</i> sp. nov., isolated from patients in Japan. <i>Microbiol. Immunol.</i> , 2004, 48 , 271-276.
<i>N. takedensis</i>	2005	Yamamura (H.), Hayakawa (M.), Nakagawa (Y.), Tamura (T.), Kohno (T.), Komatsu (F.) and Iimura (Y.): <i>Nocardia takedensis</i> sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2005, 55 , 433-436.
<i>N. terpenica</i>	2007	Hoshino (Y.), Watanabe (K.), Iida (S.), Suzuki (S.), Kudo (T.), Kogure (T.), Yazawa (K.), Ishikawa (J.), Kroppenstedt (R.M.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia terpenica</i> sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2007, 57 , 1456-1460.
<i>N. testacea</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Nishimura (K.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia testaceus</i> sp. nov. and <i>Nocardia senatus</i> sp. nov., isolated from patients in Japan. <i>Microbiol. Immunol.</i> , 2004, 48 , 271-276.
<i>N. thailandica</i>	2005	Kageyama (A.), Poonwan (N.), Yazawa (K.), Suzuki (S.), Kroppenstedt (R.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia vermiculata</i> sp. nov. and <i>Nocardia thailandica</i> sp. nov. isolated from clinical specimens. <i>Actinomycetologica</i> , 2004, 18 , 27-33.

Especie	Año de descripción	Publicación primera descripción de caso clínico
<i>N. transvalensis</i>	1927	Pijper (A.) and Pullinger (B.D.): South African Nocardioses. <i>Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i> , 1927, 30 , 153-156.
<i>N. vermiculata</i>	2004	Kageyama (A.), Poonwan (N.), Yazawa (K.), Suzuki (S.), Kroppenstedt (R.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia vermiculata</i> sp. nov. and <i>Nocardia thailandica</i> sp. nov. isolated from clinical specimens. <i>Actinomycetologica</i> , 2004, 18 , 27-33.
<i>N. veterana</i>	2001	Gürtler (V.), Smith (R.), Mayall (B.C.), Pötter-Reinemann (G.), Stackebrandt (E.) and Kroppenstedt (R.M.): <i>Nocardia veterana</i> sp. nov., isolated from human bronchial lavage. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2001, 51 , 933-936.
<i>N. vulneris</i>	2014	Lasker (B. A.), Bell (M.), Klenk (H.-P.), Spröer (C.), Schumann, (P.) and Brown, J. M. 2014. <i>Nocardia vulneris</i> sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 106 , 543-553.
<i>N. wallacei</i>	2006	Conville (P.S.), Brown (J.M.), Steigerwalt (A.G.), Brown-Elliott (B.A.) and Witebsky (F.G.): <i>Nocardia wallacei</i> , sp. nov., and <i>Nocardia blacklockiae</i> , sp. nov., human pathogens and members of the " <i>Nocardia transvalensis</i> complex". <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2008, 46 , 1178-1184.
<i>N. yamanashiensis</i>	2004	Kageyama (A.), Yazawa (K.), Nishimura (K.) and Mikami (Y.): <i>Nocardia inohanensis</i> sp. nov., <i>Nocardia yamanashiensis</i> sp. nov. and <i>Nocardia niigatensis</i> sp. nov., isolated from clinical specimens. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, 54 , 563-569.

ANEXO II Características de los principales agentes antimicrobianos empleados para el tratamiento de la nocardiosis en humanos.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Posología recomendada en adultos	Otros
Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMX) o Cotrimoxazol	Sulfametoxazol es una sulfonamida que inhibe la síntesis de ácido dihidrofólico y Trimetoprim actúa como inhibidor de la dihidrofolato reductasa, las dos enzimas que intervienen en la síntesis del ácido tetrahidrofólico impidiendo la producción de purinas	- 5-10 mg/kg TMP: 25 - 50 mg/kg SMX - 1-3 meses para infecciones cutáneas - 6-12 meses para infecciones pulmonares - ≥12 meses para infecciones del sistema nervioso central.	
Aminoglucósidos (estreptomicina, gentamicina, amikacina y netilmicina)	Inhibición la síntesis proteica por unión al ARNr 16S de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y por ruptura de la pared celular.	- Amikacina: Dosis diaria 15 mg/Kg/día - Gentamicina, Tobramicina: Dosis diaria 4-5 mg/Kg/día	Ototoxicidad y nefrotoxicidad
Tetraciclinas (segunda generación - doxiciclina y minociclina- y gliciliclinas de tercera generación - tigeciclina-)	-Desacopla la fosforilación oxidativa. -Inhibe la síntesis proteica en el ribosoma de la bacteria al unirse a la subunidad 30S del ribosoma y no permitir la unión del ácido ribonucléico de Transferencia (tRNA) -Altera la membrana citoplasmática	- 250 mg/ 6 horas - 500 mg/ 12 horas - 500mg/ 6 horas en infecciones severas	Terapia única o de refuerzo con TMP-SMX o imipenem

Antibiótico	Mecanismo de acción	Posología recomendada en adultos	Otros
Betalactámicos (Amoxicilina, Ampicilina)	Inhibición de la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared bacteriana	- 500/125 mg, 3 veces al día - 875/125 mg 2 veces, durante 6-12 meses	Sensibles a la enzima beta-lactamasa, por lo cual se suelen administrar acompañados de ácido clavulánico u otro inhibidor de esta enzima
Carbapenémico (imipenem)	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	1.5- 2 g/día en combinación con 15 mg/kg/día de amikacina.	Se emplea como parte de un triple esquema de TMP-SMX, amikacina e imipenem en caso de afectación del SNC
Fluorquinolonas (ciprofloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino)	Inhiben la actividad de la enzima ADN girasa, una topoisomerasa	400 mg/día	Moxifloxacino y gatifloxacino pueden causar eritema cutáneo, neuropatía periférica y toxicidad cardíaca o hepática
Rifampicina	Inhibición de la enzima RNA polimerasa ADN dependiente	- 450-600 mg/día - 900-1.200 mg/día en casos graves	Las especies del género <i>Nocardia</i> son capaces de inactivarla por glicosilación y fosforilación
Oxazolidinona (Linezolid)	Inhibición de la iniciación en la síntesis de proteínas bacterianas	600 mg/12 horas	La interrupción del tratamiento origina mielosupresión, neuropatía periférica y acidosis láctica. Se está ensayando un nuevo derivado, tedizolid
Benzotiazinona	Inhibición de la producción de decaprenilfosforil arabinosa, un precursor de la síntesis de arabinanos, componentes de la pared celular de las actinobacterias.		

ANEXO III: Cuadro resumen de los principales estudios clínicos que incluyen más de 30 cepas de *Nocardia* spp. en los últimos 20 años para el estudio de la distribución de especies. La especie mayoritaria aparece en negrita.

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuidas por especies	Características del estudio
“Nocardiosis, a clinic-epidemiological profile over 10 years” M.M. Ninan, P. Rupali, P. Mohanraj, J.S. Michael	2016	Sur de India	131 cepas: <i>N. asteroides</i> :73 <i>Nocardia</i> spp.:32 <i>N. brasiliensis</i> : 2	Estudio retrospectivo de 10 años (2004-2013) realizado en un centro de atención terciaria
“Antimicrobial-resistant <i>Nocardia</i> isolates, Taiwan” C. C. Lai, W. L. Liu, W. C. Ko, Y. H. Chen, H. J. Tang, Y. T. Huang, <i>et al.</i>	2011	Taiwan	138 cepas: <i>N. brasiliensis</i> : 58 <i>N. cyriacigeorgica</i> :22 <i>N. farcinica</i> : 11 <i>N. beijingensis</i> :8 <i>N. otitidiscaviarum</i> :7 <i>N. nova</i> : 6 <i>N. puris</i> : 6 <i>N. asiatica</i> :5 <i>N. flavorosea</i> : 5 <i>N. abscessus</i> : 3 Otros: 7	Estudio de resistencia entre los años 1998–2009
“Clinical Spectrum and Outcome of <i>Nocardia</i> Infection: Experience of 15-Year Period from a Single Tertiary Medical Center” E. Hardak, M. Yigla, G. Berger, H. Sprecher, I. Oren.	2012	Irán	55 cepas Entre 1996-2003: <i>Nocardia</i> sp. 23 <i>N. asteroides</i> : 13 <i>N. brasiliensis</i> : 3 Entre 2003-2010: <i>N. cyriacigeorgica</i> : 10 <i>N. farcinica</i> :4, <i>N. miyunensis</i> : 1 <i>N. asiatica</i> : 1	Estudio retrospectivo de las características clínicas de <i>Nocardia</i> spp. durante un período de 15 años (1996-2010)

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuidas por especies	Observaciones
<p>“Infection with <i>Nocardia</i> Species: Clinical Spectrum of Disease and Species Distribution in Madrid, Spain, 1978–2001”</p> <p>V. Pintado, E. Gómez-Mampaso, J. Fortún, M.A. Meseguer, J. Cobo, E. Navas, C. Quereda, P. Martín-Dávila, S. Moreno.</p>	2002	España	<p>34 cepas</p> <p><i>N. asteroides</i>: 10 <i>N. farcinica</i>: 4 <i>N. nova</i>: 3 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 1 <i>Nocardia</i> spp.:16</p>	Estudio retrospectivo durante un período de 24 años (1978-2001) en un hospital de 1100 camas
<p>“Nocardiosis at the Turn of the Century”</p> <p>M. V. Minero, M. Marín, E. Cercenado, P. M. Rabadán, E. Bouza, P. Muñoz.</p>	2009	España	<p>37 cepas</p> <p><i>N. cyriacigeorgica</i>: 12 <i>N. farcinica</i>: 9 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 4 <i>N. veterana</i>: 3 <i>N. abscessus</i>: 2 <i>N. asiatica</i>: 1 <i>N. beijingensis</i>: 1 <i>N. brasiliensis</i>: 1 <i>N. carnea</i>: 1 <i>N. nova</i>: 2 <i>Nocardia</i> sp.: 1</p>	Cepas aisladas entre los años 1995 y 2006
<p>“Clinical characteristics, microbiology, and outcomes for patients with lung and disseminated nocardiosis in a tertiary hospital”</p> <p>H. K. Wang, W. H. Sheng, C. C. Hung, Y. C. Chen, M. H. Lee, W. S. Lin, P.R. Hsueh, S. C. Chang</p>	2015	Taiwan	<p>81 cepas</p> <p><i>N. brasiliensis</i>: 46 <i>N. asteroides</i>: 32 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 1 <i>Nocardia</i> spp.: 2</p>	Estudio retrospectivo durante 18 años (1998-2006)

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuidas por especies	Observaciones
<p>“Antibiotic susceptibility testing and species identification of <i>Nocardia</i> isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010-2015”</p> <p>D. Lebeaux, E. Bergeron, J. Berthet, J. Djadi-Prat, D. Mouniee, P. Boiron, O. Lortholary , V. Rodriguez-Nava</p>	2019	Francia	<p>793 cepas</p> <p><i>N. farcinica</i>: 160 <i>N. abscessus</i>: 158 <i>N. beijingensis</i>: 22 <i>N. asiatica</i>: 4 <i>N. testacae</i>: 2 <i>N. nova</i> complex 155 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 102 <i>N. brasiliensis</i>: 55 <i>N. transvalensis</i> complex: 51 <i>N. blacklockiae</i>: 1 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 13 <i>N. brevicatena /paucivorans</i> complex: 11 <i>N. pseudobrasiliensis</i>: 8 <i>N. flavorosea</i>: 7 <i>N. cerradoensis</i>: 6 <i>N. mexicana</i>: 4 <i>N. carnea</i>: 3 <i>N. jiangxiensis</i>: 3 <i>N. goodfellowii</i>: 2 <i>N. asteroides</i>: 2 <i>N. puris</i>: 2 <i>N. higoensis</i>: 2 <i>N. mikamii</i>: 2 <i>N. pneumoniae</i>: 2 <i>N. coubleae</i>: 1 <i>N. altamirensis</i>: 1 <i>N. elegans</i>: 1 <i>N. neocaledoniensis</i>: 1 <i>N. concava</i>: 1 <i>N. rhamnosiphila</i>: 1 <i>N. takedensis</i>: 1 <i>N. uniformis</i>: 1 <i>N. vinacea</i>: 1 <i>Nocardia</i> spp. 36</p>	Estudio retrospectivo de cepas recibidas entre 2010 y 2015

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuídas por especies	Observaciones
<p>“Antimicrobial susceptibility profiles and species distribution of medically relevant <i>Nocardia</i> species: Results from a large tertiary laboratory in Australia”</p> <p>Y. E. Tan, S. C.-A. Chen, C. L. Halliday</p>	2020	Australia	270 cepas <i>N. nova</i> complex: 80 <i>N. cyriacigeorgica</i> 61 <i>N. brasiliensis</i> 52 <i>N. farcinica</i> 38 <i>N. pseudobrasiliensis</i> : 8 <i>N. beijingensis</i> : 6 <i>N. transvalensis</i> complex: 4 <i>N. abscessus</i> complex 4 <i>Nocardia</i> spp.: 17	Estudio retrospectivo entre los años 2011 y 2016
<p>“Clinical characteristics, microbiology, and outcomes for patients with lung and disseminated nocardiosis in a tertiary Hospital”</p> <p>H. K. Wang, W. H. Sheng, C. C. Hung, Y. C. Chen, M. H. Lee, W. S. Lin, P. R. Hsueh, S. C. Chang</p>	2014	Texas, E. E. U. U.	138 cepas <i>N. nova</i> : 27 <i>N. cyriacigeorgica</i> : 25 <i>N. farcinica</i> : 19 <i>N. abscessus</i> : 11 <i>Nocardia</i> spp.: 56	Estudio retrospectivo de las infecciones hospitalarias entre 1988-2006
<p>“Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of <i>Nocardia</i> species among patients with nocardiosis”</p> <p>A. Hashemi-Shahraki, P. Heidarieh, S. Z. Bostanabad, M. Hashemzadeh, M. M. Feizabadi, D. Schraufnagel & M. Mirsaedi</p>	2015	Iran	127 cepas: <i>N. cyriacigeorgica</i> : 35 <i>N. asteroides</i> : 30 <i>N. farcinica</i> : 26 <i>N. otitidiscaviarum</i> : 12 <i>N. abscessus</i> : 10	Estudio retrospectivo de cepas aisladas en tres regiones del Iran entre los años 2009 y 2015
<p>“Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main <i>Nocardia</i> species in Spain”</p> <p>S. Valdezate, N. Garrido, G. Carrasco, M. J. Medina-Pascual, P. Villalon, A. M. Navarro and J. A. Saez-Nieto</p>	2017	España	1119 cepas <i>N. cyriacigeorgica</i> : 283 <i>N. nova</i> complex: 168 <i>N. abscessus</i> : 142 <i>N. farcinica</i> : 128 <i>N. carnea</i> : 48 <i>N. brasiliensis</i> : 39 <i>N. otitidiscaviarum</i> : 35 <i>N. flavorosea</i> : 29 <i>N. rhamnosiphila</i> : 29 <i>N. transvalensis</i> : 27 <i>Nocardia</i> spp. menor prevalencia: 191	Estudio de las cepas identificadas en el CNM durante 10 años (2005–14)

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuidas por especies	Observaciones
<p>“Nocardiosis: 7-year experience at an Australian tertiary hospital”</p> <p>E. K. Paige, D. Spelman</p>	2018	Melbourne, Australia	<p>68 cepas</p> <p><i>N. nova</i>: 20 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 12 <i>N. farcinica</i>: 10 <i>N. paucivorans</i>: 6 <i>N. takedensis</i>: 3 <i>N. brasiliensis</i>: 3 <i>N. veterana</i>: 3 <i>N. beijingensis</i>: 1 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 1 <i>Nocardia</i> sp.: 9</p>	Estudio retrospectivo en las cepas recibidas en un hospital entre 2010-2016
<p>“Susceptibility Profiles of <i>Nocardia</i> Isolates Based on Current Taxonomy”</p> <p>R. Schlaberg, M. A. Fisher, K. E. Hanson</p>	2014	Utah, E.E.U.U.	<p>1.299 cepas</p> <p><i>N. abscessus</i> complex: 110 <i>N. amamiensis</i>: 2 <i>N. amikacinitorans</i>: 7 <i>N. aobensis</i>: 2 <i>N. asteroides sensu stricto</i>: 3 <i>N. beijingensis</i> complex: 30 <i>N. blacklockiae</i>: 1 <i>N. brasiliensis</i>: 148 <i>N. brevicatena</i>: 1 <i>N. carnea</i>: 2 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 264 <i>N. exalbida</i> complex: 4 <i>N. farcinica</i>: 204 <i>N. flavorosea</i>: 1 <i>N. grenadensis</i>: 2 <i>N. higoensis</i>: 2 <i>N. ignorata</i>: 1 <i>N. mexicana</i>: 1 <i>N. neocaledoniensis</i>: 1 <i>N. niigatensis</i>: 2 <i>N. niwae</i>: 6 <i>N. nova</i> complex: 566 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 29 <i>N. paucivorans</i>: 11 <i>N. pseudobrasiliensis</i>: 13 <i>N. puris</i>: 7</p>	Estudio de sensibilidad en 1.299 aislamientos de 39 especies o complejos diferentes, durante los años 2006-2011.

Anexos

			<i>N. rhamnosiphila</i> : 4 <i>N. takedensis</i> : 1 <i>N. testacea</i> : 1 <i>N. thailandica</i> : 1 <i>N. transvalensis</i> complex: 83 <i>N. vermiculata</i> : 1 <i>N. vinacea</i> : 1 <i>N. yamanashiensis</i> : 1 <i>Nocardia</i> sp. :32	
<p>“Clinical features, identification, antimicrobial resistance patterns of <i>Nocardia</i> species in China: 2009–2017”</p> <p>L. Huang, X. Chen, H. Xu, L. Sun, C. Li, W. Guo, L. Xiang, G. Luo, Y. Cui h, B. Lu</p>	2019	China	<p>53 cepas</p> <p><i>N. farcinica</i>:13 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 11 <i>N. terpenica</i>: 8 <i>N. abscessus</i>: 5 <i>N. Otitidiscaviarum</i>: 4 <i>N. nova</i>: 3 <i>N. asiatica</i>: 2 <i>N. blacklockiae</i>: 2 <i>N. brasiliensis</i>: 2 <i>N. beijingensis</i>: 1 <i>N. pseudobrasilliensis</i>:1 <i>N. transvalensis</i>: 1</p>	Estudio retrospectivo de las cepas aisladas en 8 hospitales entre los años 2009 y 2017

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuídas por especies	Observaciones
<p>“Nocardiosis in 132 Patients with Cancer, Microbiological and Clinical Analyses”</p> <p>H. L. Wang, Y. H. Seo, P. Rocco LaSala, J. J. Tarrand, X. Y. Han</p>	2014	Texas, E.E.U.U.	<p>138 cepas</p> <p><i>N. nova</i>: 27 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 25 <i>N. farcinica</i>: 19 <i>N. abscessus</i>: 11 <i>N. beijingensis</i>: 8 <i>N. veterana</i>: 7 <i>N. aobensis</i>: 4 <i>N. asteroides</i>: 4 <i>N. mikamii</i>: 4 <i>N. wallacei</i>: 4 <i>N. asiatica</i>: 3 <i>N. carnea</i>: 3 <i>N. pseudobrasiliensis</i>: 3 <i>N. brasiliensis</i>: 2 <i>N. kruczakiae</i>: 2 <i>N. africana</i>: 1 <i>N. amamiensis</i>: 1 <i>N. grenadensis</i>: 1 <i>N. harenae</i>: 1 <i>N. higoensis</i>: 1 <i>N. mexicana</i>: 1 <i>N. otitiscaviarum</i>: 1 <i>N. paucivorans</i>: 1 <i>N. pneumoniae</i>: 1 <i>N. puris</i>: 1 <i>N. vinacea</i>: 1 <i>N. yamanashiensis</i>: 1</p>	Estudio retrospectivo de las cepas aisladas en pacientes con cáncer entre los años 2002-2012

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuídas por especies	Observaciones
<p>“Pulmonary nocardiosis in Western Europe—Clinical evaluation of 43 patients and population-based estimates of hospitalization rates”</p> <p>S. R. Otta, N. Meiera, M. Kolditzc, Torsten, T. Bauerd, G. Rohdee, E. Presterlf, D. Schürmannng, P. M. Lepperh, F. C. Ringshausen, H. Flickj, S. L. Leibk, M. W. Pletzl</p>	2019	Alemania, Austria, Suiza y los Países Bajos	<p>37 cepas</p> <p><i>N. africana</i>: 1 <i>N. aobensis</i>: 2 <i>N. cerradoensis</i>: 1 <i>N. abscessus</i>: 5 <i>N. veterana</i>: 4 <i>N. carnea</i>: 1 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 3 <i>N. nova</i>: 2 <i>N. farcinica</i>: 8 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 3 <i>N. asteroides</i>: 7</p>	Estudio retrospectivo entre pacientes de distintos países del Oeste de Europa entre los años 1995 y 2011
<p>“Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004–2014”</p> <p>D. Haussaire, P. E. Fournier, K. Djiguibaa, V. Moal, T. Legris, R. Purgus, J. Bismuth, X. Elharrar, M. Reynaud-Gaubert, H. Vacher-Coponat</p>	2017	Francia	<p>34 cepas</p> <p><i>N. farcinica</i>: 9 <i>N. cyriacigeorgica</i>: 7 <i>N. abscessus</i>: 6 <i>N. nova</i>: 4 <i>N. wallacei</i>: 2 <i>N. brasiliensis</i>: 2 <i>N. asiatica</i>: 1 <i>N. neocaledoniensis</i>: 1 <i>N. transvalensis</i>: 1 <i>Nocardia sp.</i>: 1</p>	Estudio retrospectivo del hospital universitario de Marsella entre 2004 y 2014

Título de la publicación y autores	Año de publicación	Ubicación de la población de estudio	Cepas de <i>Nocardia</i> totales, y distribuidas por especies	Observaciones
<p>“Retrospective Analysis of Antimicrobial Susceptibility Profiles of <i>Nocardia</i> Species from a Tertiary Hospital and Reference Laboratory, 2011 to 2017”</p> <p>Ahmed M. Hamdi, Madiha Fida, Sharon M. Deml, Omar M. Abu Saleh, Nancy L. Wengenack</p>	2020	Minnesota, E. E. U. U.	<p>2.091 cepas</p> <p><i>N. nova</i> complex:452 <i>N. cyriacigeorgica</i> 352 <i>N. farcinica</i>:319 <i>N. brasiliensis</i> 223 <i>N. abscessus</i>:205 <i>Nocardia</i> sp.: 200 <i>N. transvalensis</i> complex: 121 <i>Nocardia asteroides</i>: 76 <i>N. otitidiscaviarum</i>: 30 <i>N. pseudobrasiliensis</i>: 21 <i>N. brevicatena/N. paucivorans</i>: 19 <i>N. niwae</i>: 14 <i>N. puris</i>: 9 <i>N. amikacinotolerans</i>:6 <i>N. carnea</i>: 5 <i>N. takedensis</i>: 5 <i>N. thailandica</i>: 5 <i>N. araoensis</i>: 4 <i>N. flavorosea</i>: 3 <i>N. mexicana</i>: 3 <i>N. exalbida</i>: 2 <i>N. ignorata</i>: 2 <i>N. jiangxiensis</i>: 2 <i>N. niigatensis</i>: 2 <i>N. testacea</i>: 2 <i>N. amamiensis</i>: 1 <i>N. anaemiae</i>: 1 <i>N. blacklockiae</i>: 1 <i>N. brevicatena</i>: 1 <i>N. higoensis</i>: 1 <i>N. higoensis/shimofusensis</i>: 12 <i>N. rhamnosiphila</i>:1 <i>N. salmonicida</i>: 1 <i>N. shimofusensis</i>: 1 <i>N. sienata</i>: 1 <i>N. vinacea</i>: 1</p>	<p>Estudio retrospectivo en un Centro médico terciario con un laboratorio de referencia durante un período de 6 años (2011-2017).</p>

ANEXO IV Pruebas clásicas para la identificación de especies de *Nocardia* de interés clínico. Tomada de Fatahi-Bafghi y colaboradores [Fatahi-Bafghi , 2018]

Species	First isolated of/ Year	Growth at 45 °C	Hydrolysis of:					Carbon utilization															Enzymes		
			X ¹	H ²	C ³	T ⁴	Esc ⁵	Glu ⁶	Suc ⁷	Ara ⁸	Xyl ⁹	Ino ¹⁰	Man ¹¹	Rha ¹²	Raf ¹³	Cel ¹⁴	Gal ¹⁵	Malt ¹⁶	Treh ¹⁷	Lac ¹⁸	Man ¹⁹	Nit ²⁰	Ure ²¹	Gel ²²	Cit ²³
<i>N. abscessus</i>	Joint abscess/ 2000	-	-	-	-	-	-	-/+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>N. aciditolerans</i>	Soil/2013	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>N. acidivorans</i>	Soil/2007	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>N. africana</i>	Sputum/2001	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>N. alba</i>	Soil ^A /2004	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>N. altamirensis</i>	Altamira Cave ^B / 2008	-	-	W	+	W	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>N. amamiensis</i>	Sugar-cane ^C / 2007	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>N. amikacinitorans</i>	Ocular and lung sources/2013	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	V	V	-	V	-	+	+	-	V	+	+	-	-	-
<i>N. anaemiae</i>	Clinical sample/ 2005	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>N. aobensis</i>	Clinical sample/ 2004	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>N. araoensis</i>	BAL (Bronchoalveolar lavage ^D)/2004	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>N. arizonensis</i>	BAL and sputum/ 2017	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. artemisiae</i>	Plant (Artemisia annua)/2011	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>N. arthritidis</i>	Sputum/2004	+	-	-	-	-	W	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. asiatica</i>	Sputum/2004	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	+
<i>N. asteroides</i> ATCC19247	1891	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>N. beijingensis</i>	Soil ^P /2004	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>N. bhagyanarayanae</i>	Callistemon citrus rhizosphere sample/2014	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N. blacklockiae</i> ATCC- C700035	Sputum/2008	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>N. boironii</i>	Pus sample/2016	-	-	+	-	+	+	-	-	-	W	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. brasiliensis</i> ATCC19296	1980	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>N. brevicatena</i>	1961	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. caishijiensis</i>	Soil/2003	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. callitridis</i>	Root of the tree/ 2010	-	-	-	+	-	+	+	-	W	-	-	-	+	-	+	-	W	-	-	-	-	+	+	+
<i>N. camponoti</i>	Ant/2016	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>N. carnea</i> DSM43397	1891	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>N. casuarinae</i>	Root nodules/ 2014	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. cavernae</i>	cave sample/ 2017	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>N. cerradoensis</i>	Soil/2003	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. concava</i>	Clinical sample/ 2005	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>N. coubleae</i>	Soil/2007	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>N. crassostreae</i>	Oyster/1998	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. cummideleus</i>	Soil/2000	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Species	First isolated of/ Year	Growth at 45 °C	Hydrolysis of:					Carbon utilization															Enzymes			
			X ¹	H ²	C ³	T ⁴	Esc ⁵	Glu ⁶	Suc ⁷	Ara ⁸	Xyl ⁹	Ino ¹⁰	Man ¹¹	Rha ¹²	Raf ¹³	Cel ¹⁴	Gal ¹⁵	Malt ¹⁶	Treh ¹⁷	Lac ¹⁸	Man ¹⁹	Nit ²⁰	Ure ²¹	Gel ²²	Cit ²³	
<i>N. cyriaciorgica</i>	Bronchial secretion/2001	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>N. donostiensis</i>	Sputum and BAL/ 2016	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. elegans</i>	Sputum/2005	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. endophytica</i>	Oil-seed plant/ 2011	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>N. exalbida</i>	BAL/2006	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>N. farcinica</i> ^{ATCC3318}	Horse/1889	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. flavorosea</i>	Soil ^g /1998	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. fluminea</i>	Soil/2000	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. gamkensis</i>	Soil ^g /2006	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	W	W	+	W	-	-	-	-
<i>N. goodfellowii</i>	Soil/2012	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. grenadensis</i>	Sand ^g /2012	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>N. halotolerans</i>	Saline soil/2015	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. harenae</i>	Beach sand/2006	-	-	-	-	-	+	-	-	-	W	-	-	W	-	W	W	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>N. heshunensis</i>	Soil/2017	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>N. higoensis</i>	Lung/2004	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. ignorata</i>	Clinical sample/ 2001	+	-	-	-	-	+	+	W	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. inohanensis</i>	Clinical sample/ 2004	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>N. iowensis</i>	Soil/2009	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. jejuensis</i>	Cave/2006	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. jiangsuensis</i>	Soil/2016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. jiangxiensis</i>	Soil ^g /2005	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>N. jinanensis</i>	Soil ^g /2009	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	W	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>N. kroppenstedtii</i>	BAL/2014	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. krucakiae</i>	BAL/2004	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. lasii</i>	Ant/2016	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N. lijiangensis</i>	Soil/2006	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N. mexicana</i>	Mycetoma/2004	-	-	+	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N. mikamii</i>	Respiratory specimen/2010	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>N. miyunensis</i>	Soil/2005	-	-	-	+	-	+	+	W	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. neocaledoniensis</i>	Soil ^g /2004	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. niigatensis</i>	Skin abscess/ 2004	-	-	W	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-
<i>N. ninae</i>	BAL/2007	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	W	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>N. niwae</i>	Respiratory specimen/2011	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>N. nova</i>	Respiratory specimen	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>N. otitidiscaviarum</i>	Animal (guinea pig)/1924	V	-	V	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>N. paucivorans</i>	Sputum and BAL/ 2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>N. pigrifragens</i>	Contaminated agar plate/2004	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. pneumoniae</i>	Sputum/2004	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>N. polyresistens</i>	Soil/2005	-	+	+	D	D	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>N. pseudobrasiliensis</i> ^{ATCC 3313}	Leg abscess/1996	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+

ANEXO V Protocolo para la elaboración de los test de sensibilidad antibiótica

-Preparación del inóculo: Paso previo a la realización del AST en los tres protocolos siguientes. Se toman las colonias maduras de *Nocardia* spp. del medio de crecimiento con un hisopo estéril y se transfiere a 4,5 ml de agua estéril. Después se añaden de 5-7 perlas de vidrio estériles de 5 mm a cada muestra y se vortea hasta conseguir la ruptura de las colonias.

-Microdilución en caldo: Se prepara un estándar de turbidez de 0,5 McFarland. El contenido completo de la suspensión de 30 ml se añade a la bandeja de inoculación. Los paneles de microdilución con los antibióticos en concentraciones crecientes se inoculan usando un inoculador con puntas, depositando 10 µl de la suspensión en cada pocillo. Los paneles de microdilución han de etiquetarse y cubrirse con una película de plástico antes de su posterior incubación a 35 ± 2 ° C en aire ambiente. Los paneles se leen a los 3 días, llegando a 5 días para aquellos aislamientos que muestran un crecimiento insuficiente en el control positivo [CLSI, 2018].

Actualmente, CLSI considera la microdilución en caldo como la técnica estándar de referencia para *Nocardia* spp. [Lebaux, 2019], aunque la interpretación de las CMIs de *Nocardia* utilizando este método ha resultado ser controvertida. En un estudio multicéntrico de comparación, se ha identificado gran variabilidad interlaboratorio debido posiblemente a la diferencia en la consistencia de inóculo, la subjetiva interpretación de los puntos de corte, las características de crecimiento de cada colonia en particular, etc. lo cual hace complicada la reproducibilidad de los resultados obtenidos por este método [Schlaberg, 2014]. Una alternativa válida que disminuye las diferencias de interpretación y permite la lectura del antibiograma en aislamiento de difícil crecimiento, lo constituye el E-test [Valdezate, 2017]. La difusión en disco constituye otra aproximación al estudio de la susceptibilidad en este género, sin embargo, no existen puntos de corte consensuados con este método cualitativo [Lebeaux, 2019]. Actualmente sólo se recomienda para confirmar la resistencia a sulfomanida [Tan, 2020; CLSI, 2018], ya que se han detectado falta de correlación con los métodos cuantitativos errores encontrados, inclinando la balanza a favor del E-test como método de rutina en laboratorio [Perçin, 2011].

-E-test: Se toma la muestra del sobrenadante ajustándolo con agua estéril hasta una turbidez equivalente a 1,0 en la escala McFarland [Schalberg, 2014]. Las muestras se siembran en placas de agar sangre Mueller-Hinton y se colocan las tiras de antibiótico de concentración creciente. Se mide la concentración mínima inhibitoria (MIC) después de 48 h de incubación (72 h si es necesario) a 37° C en aerobiosis [CLSI, 2018]. El resultado es el valor al cual la zona de inhibición intercepta con la escala que muestra la tira de E-test. Cuando el crecimiento se encuentra entre dos valores sucesivos de concentración

de la tira antibiótica, se debe tomar como resultado la siguiente dilución más alta en la escala [Valdezate, 2017].

-Difusión en disco: La prueba de difusión de disco se realiza a partir de una suspensión estandarizada de 0,5 McFarland. Se colocan los discos antimicrobianos en placas de agar sangre Mueller-Hinton utilizando una plantilla diseñada para proporcionar la máxima distancia entre los discos. Las placas se incuban a 35 ± 2 ° C en aire ambiente durante 3 - 5 días [Wallace, 1977]. Actualmente es una técnica en desuso, aunque el CLSI la recomienda para confirmar la resistencia a sulfomanida [Tan, 2020] y se sigue empleando en la actualidad en el OFN (*Observatoire Français des Nocardioses*) para el estudio de la sensibilidad [Lebeaux, 2019].

En 1997 se compararon los resultados de AST obtenidos por los métodos de microdilución en caldo, difusión en disco, dilución en agar, E-test y el método radiométrico BACTEC, en 26 aislamientos de *Nocardia* spp. Se observó 100% de concordancia entre los resultados de la difusión en disco con la microdilución en caldo para amikacina, eritromicina, imipenem, minociclina y trimetoprim-sulfametoxazol, pero sólo entre el 80% y el 88% de concordancia para ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftriaxona y ciprofloxacino. La concordancia general calculada para el método de difusión en disco con la técnica estándar fue del 95,7%. Se trata de un método controvertido, pues un estudio posterior que incluía 21 cepas de *Nocardia* spp. concluyó que la difusión en disco no es fiable debido a las altas tasas de errores encontrados, inclinando la balanza a favor del E-test como método de rutina en laboratorio [Perçin, 2011].

ANEXO VI Compuestos bioactivos aislados en cepas del género *Nocardia*. Tomadas de Luo y colaboradores [Luo, 2014].

Compound	Molecular formula	Appearance	Description or antibiotic type	Source	Year	Main biological activity	Reference
Nocardicin A	C ₂₃ H ₂₄ N ₄ O ₉	Colourless crystals	β-lactam	<i>N. uniformis</i> subsp. <i>tsuyamanensis</i> ATCC 21806	1976	Antibacterial (G-)	Aoki <i>et al.</i> (1976); Hashimoto <i>et al.</i> (1976); Kurita <i>et al.</i> (1976)
Nocardicin B	C ₂₃ H ₂₄ N ₄ O ₉	Colourless crystals	β-lactam	<i>N. uniformis</i> subsp. <i>tsuyamanensis</i> ATCC 21806	1976	Antibacterial (G-)	Aoki <i>et al.</i> (1976); Hashimoto <i>et al.</i> (1976); Kurita <i>et al.</i> (1976)
Nargenicin (CP-47,444/CS-682)	C ₂₈ H ₃₇ NO ₈	White powder	10- membered macrolide	<i>N. argentinensis</i> ATCC 31306; <i>Nocardia</i> sp. CS682	1977; 2008	Anti-MRSA	Celmer <i>et al.</i> (1977; 1980); Sohng <i>et al.</i> (2008)
Erythromycin E	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₄	NA	14-membered macrolide	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0466	1999	NA	Mikami <i>et al.</i> (1999)
HS-6	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	Colourless fluffy solid	16-membered macrolide	<i>N. otitidiscaviarum</i> IFM 0273	1990	Cytotoxic, antifungal	Mikami <i>et al.</i> (1990)
PC-766B	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	Colourless powder	16-membered macrolide	<i>N. brasiliensis</i> SC-4710	1993	Antimicrobial, antitumoral	Kumagai <i>et al.</i> (1993a,b)
Tubelactomicin A	C ₂₉ H ₄₂ O ₆	White powder	16-membered macrolide	<i>N. vinacea</i> MK703-102F1	2000	Anti-acid-fast bacterial	Igarashi <i>et al.</i> (2000a,b); Kinoshita <i>et al.</i> (2001)
Brasilinolide A	C ₅₇ H ₉₈ O ₂₄	Colourless amorphous solid	32-membered macrolide	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0406	1996	Immunosuppressive, antifungal	Shigemori <i>et al.</i> (1996); Tanaka <i>et al.</i> (1997b)
Brasilinolide B	C ₅₉ H ₁₀₄ O ₂₃	White microcrystal	32-membered macrolide	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0466	2000	Antifungal	Mikami <i>et al.</i> (2000)
Brasilicardin A	C ₄₅ H ₆₈ N ₂ O ₁₆	Colourless amorphous solid	Terpenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0406	1998	Immunosuppressive, antitumoral	Shigemori <i>et al.</i> (1998); Komaki <i>et al.</i> (1999)
Brasilicardin B	C ₄₄ H ₆₆ N ₂ O ₁₅	Colourless amorphous solid	Terpenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0406	2004	Immunosuppressive, cytotoxic	Komatsu <i>et al.</i> (2004)
Brasilicardin C	C ₃₀ H ₅₁ NO ₉	Colourless amorphous solid	Terpenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0406	2004	Immunosuppressive, cytotoxic	Komatsu <i>et al.</i> (2004)
Brasilicardin D	C ₂₉ H ₄₉ NO ₈	Colourless amorphous solid	Terpenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0406	2004	Immunosuppressive, cytotoxic	Komatsu <i>et al.</i> (2004)
SO-75R1	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₁	Orange crystal	Anthracycline	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0075	1992	Antibacterial (G+)	Maeda <i>et al.</i> (1992); Mikami <i>et al.</i> (1992)
M-3	C ₂₂ H ₂₄ O ₅	Yellow crystal	Anthracycline	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0075	1994	NA	Maeda <i>et al.</i> (1994)
M-4	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	Red crystal	Anthracycline	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0075	1994	NA	Maeda <i>et al.</i> (1994)
M-13-1	C ₂₁ H ₁₆ O ₅	Orange powder	Anthracycline	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0075	1994	NA	Maeda <i>et al.</i> (1994)
Nocardicycline A	C ₃₀ H ₃₆ NO ₁₁	Reddish microcrystal	Anthracycline	<i>N. pseudobrasiliensis</i> IFM 0624	1997	Cytotoxic, antibacterial (G+)	Tanaka <i>et al.</i> (1997a)
Nocardicycline B	C ₃₂ H ₃₇ NO ₁₂	Reddish microcrystal	Anthracycline	<i>N. pseudobrasiliensis</i> IFM 0624	1997	Antibacterial (G+)	Tanaka <i>et al.</i> (1997a)
Nothramycin	C ₃₀ H ₃₇ NO ₁₁	Red powder	Anthracycline	<i>Nocardia</i> sp. MJ896-43F17	1998	Antimycobacterial	Momose <i>et al.</i> (1998)
Brasiliquinone A	C ₂₆ H ₂₇ NO ₇	Red powder	Benz[<i>a</i>]anthraquinone	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0089	1996	Antibacterial (G+), antitumoral	Tsuda <i>et al.</i> (1996); Nemoto <i>et al.</i> (1997)
Brasiliquinone B	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	Yellow powder	Benz[<i>a</i>]anthraquinone	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0089	1996	Antibacterial (G+), antitumoral	Tsuda <i>et al.</i> (1996); Nemoto <i>et al.</i> (1997)
Brasiliquinone C	C ₂₁ H ₁₈ O ₅	Yellow powder	Benz[<i>a</i>]anthraquinone	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0089	1996	Antibacterial (G+), antitumoral	Tsuda <i>et al.</i> (1996); Nemoto <i>et al.</i> (1997)
Brasiliquinone D	C ₂₈ H ₂₉ NO ₈	Red amorphous solid	Benz[<i>a</i>]anthraquinone	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0667	1999	Cytotoxic, antibacterial	Tsuda <i>et al.</i> (1999)
Nocarasin A	C ₁₇ H ₂₄ O ₂	Colourless oil	Benzenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0667	1999	Cytotoxic, antibacterial	Tsuda <i>et al.</i> (1999)
Nocarasin B	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	Colourless oil	Benzenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0667	1999	Cytotoxic, antibacterial	Tsuda <i>et al.</i> (1999)
Nocarasin C	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	Colourless oil	Benzenoid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0667	1999	Cytotoxic, antibacterial	Tsuda <i>et al.</i> (1999)
Brasilidine A	C ₁₇ H ₁₈ N ₂	Yellowish amorphous solid	Indole alkaloid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0089	1997	Cytotoxic, antibacterial (G+), antifungal	Kobayashi <i>et al.</i> (1997)
Nocobactin NA-a	C ₃₈ H ₅₈ N ₅ O ₁₀	White powder	Siderophore	<i>N. farcinica</i> ATCC 3318	1977	Cytotoxic	Ratledge and Snow (1974); Sakagami <i>et al.</i> (2005); Hoshino <i>et al.</i> (2011)
Nocobactin NA-b	C ₄₀ H ₆₂ N ₅ O ₁₀	White powder	Siderophore	<i>N. farcinica</i> ATCC 3318	1977	Cytotoxic	Ratledge and Snow (1974); Sakagami <i>et al.</i> (2005); Hoshino <i>et al.</i> (2011)
BE-32030 A	C ₃₉ H ₆₁ N ₅ O ₁₀	NA	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. A32030	1997	Antitumoral	Tsukamoto <i>et al.</i> (1997)
BE-32030 B	C ₄₁ H ₆₅ N ₅ O ₁₀	NA	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. A32030	1997	Antitumoral	Tsukamoto <i>et al.</i> (1997)
BE-32030 C	C ₄₃ H ₆₇ N ₅ O ₁₀	NA	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. A32030	1997	Antitumoral	Tsukamoto <i>et al.</i> (1997)
BE-32030 D	C ₃₉ H ₆₁ N ₅ O ₁₁	NA	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. A32030	1997	Antitumoral	Tsukamoto <i>et al.</i> (1997)
BE-32030 E	C ₄₁ H ₆₃ N ₅ O ₁₁	NA	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. A32030	1997	Antitumoral	Tsukamoto <i>et al.</i> (1997)
Formobactin	C ₃₈ H ₅₇ N ₅ O ₁₀	White powder	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. ND20	1996	Free radical scavenging	Murakami <i>et al.</i> (1996)

Compound	Molecular formula	Appearance	Description or antibiotic type	Source	Year	Main biological activity	Reference
Amamistatin A	C ₃₇ H ₅₉ N ₉ O ₁₁	Brown oil	Siderophore	<i>N. asteroides</i> SCRC-A2359	1999	Antitumoral	Suenaga <i>et al.</i> (1999); Kokubo <i>et al.</i> (2000)
Amamistatin B	C ₃₆ H ₅₃ N ₉ O ₁₀	Brown oil	Siderophore	<i>N. asteroides</i> SCRC-A2359	1999	Antitumoral	Suenaga <i>et al.</i> (1999); Kokubo <i>et al.</i> (2000)
Asterobactin	C ₃₄ H ₅₉ N ₇ O ₁₃	Colourless wax	Siderophore	<i>N. asteroides</i> IFM 0959	2002	Antitumoral	Nemoto <i>et al.</i> (2002)
Brasilibactin A	C ₄₂ H ₆₇ N ₉ O ₁₀	Colourless amorphous solid	Siderophore	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0995	2005	Cytotoxic	Tsuda <i>et al.</i> (2005)
Nocardimicin A	C ₃₇ H ₅₉ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0674	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005b)
Nocardimicin B	C ₃₉ H ₅₉ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0674	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005b)
Nocardimicin C	C ₃₉ H ₅₉ N ₉ O ₉	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0674	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005b)
Nocardimicin D	C ₄₁ H ₆₃ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0674	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005b)
Nocardimicin E	C ₄₁ H ₆₃ N ₉ O ₉	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0674	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005b)
Nocardimicin F	C ₄₃ H ₆₇ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> sp. TP-A0674	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005b)
Nocardimicin G	C ₄₀ H ₆₃ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>N. nova</i> JCM 6044	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005a)
Nocardimicin H	C ₄₂ H ₆₇ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>N. nova</i> JCM 6044	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005a)
Nocardimicin I	C ₄₄ H ₇₁ N ₉ O ₁₀	Pale yellow amorphous solid	Siderophore	<i>N. nova</i> JCM 6044	2005	Muscafinic M3 receptor binding inhibition	Ikeda <i>et al.</i> (2005a)
Nocardichelin A	C ₄₀ H ₆₃ N ₉ O ₈	Colourless solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> strain Acta 3026	2007	Antitumoral	Schneider <i>et al.</i> (2007)
Nocardichelin B	C ₃₈ H ₆₁ N ₉ O ₈	Colourless solid	Siderophore	<i>Nocardia</i> strain Acta 3026	2007	Antitumoral	Schneider <i>et al.</i> (2007)
Nocathiacin I	C ₆₁ H ₉₀ N ₁₄ O ₁₈ S ₅	Yellow amorphous solid	Thiazolyl peptide	<i>Nocardia</i> sp. ATCC 202099	2003	Antibacterial (G+)	Leet <i>et al.</i> (2003); Li <i>et al.</i> (2003)
Nocathiacin II	C ₆₁ H ₉₀ N ₁₄ O ₁₇ S ₅	Yellow amorphous solid	Thiazolyl peptide	<i>Nocardia</i> sp. ATCC 202099	2003	Antibacterial (G+)	Leet <i>et al.</i> (2003); Li <i>et al.</i> (2003)
Nocathiacin III	C ₆₂ H ₉₃ N ₁₃ O ₁₈ S ₅	Yellow amorphous solid	Thiazolyl peptide	<i>Nocardia</i> sp. ATCC 202099	2003	Antibacterial (G+)	Leet <i>et al.</i> (2003); Li <i>et al.</i> (2003)
Nocardithiocin	C ₄₈ H ₆₈ N ₁₂ O ₁₁ S ₈	White powder	Thiazolyl peptide	<i>N. pseudobrasiliensis</i> IFM 0757	2009	Anti-acid-fast bacterial	Mukai <i>et al.</i> (2009)
Transvalencin A	C ₂₃ H ₂₇ ClN ₄ O ₆ S ₃ Zn	Colourless prism	Thiazolidine zinc complex	<i>N. transvalensis</i> IFM 10065	2004	Antifungal	Hoshino <i>et al.</i> (2004a,b)
Transvalencin Z	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₆	White powder	salicylic acid residue-containing (Siderophore-like)	<i>N. transvalensis</i> IFM 10065	2006	Antibacterial (G+)	Mukai <i>et al.</i> (2006)
SF2457	C ₂₇ H ₃₈ N ₆ O ₉	Colourless powder	Related to amioctin	<i>N. brasiliensis</i> SF 2457	1990	Antibacterial	Miyadon <i>et al.</i> (1990); Itoh and Miyadon (1992)
Ayamycin	C ₁₄ H ₁₆ Cl ₂ NO ₃	Colourless crystals	1,1-dichloro-4-ethyl-5-(4-nitro-phenyl)-hexan-2-one	<i>Nocardia</i> sp. ALAA2000	2008	Antimicrobial	EI-Gendy <i>et al.</i> (2008)
EDDS	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Colourless needles	N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid	<i>N. brasiliensis</i> IFM 0321, 0355, 0568, 0596	1997	Phospholipase C inhibition	Imai <i>et al.</i> (1997)

ANEXO VI Software de uso libre para el análisis de datos de secuenciación masiva. Tomada de Hernández y cols, 2019 [Hernández, 2019].

Acción	Programa	Sitio web
Asignación taxonómica	RDP	https://rdp.cme.msu.edu/
	Greengenes	http://greengenes.secondgenome.com/
	Silva	www.arb-silva.de
Calidad de secuencia	FastQC	www.bioinformatics.babraham.ac.uk
	TRIMMOMATIC	http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic
	PRINSEQ	http://prinseq.sourceforge.net/
Identificación	K-merFinder	www.genomicepidemiology.org
	BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
	MEGAN	http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/malt
	Kraken	https://ccb.jhu.edu/software/kraken/
Ensamblado	SPAdes	http://bioinf.spbau.ru/spades
	Velvet	www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet
	MIRA	www.chevreux.org/projects_mira.html
Alineamiento	Mauve	http://darlinglab.org/mauve/mauve.html
Visualización	ACT	www.sanger.ac.uk/science/tools
	Artemis	www.sanger.ac.uk/science/tools
	ClustalW	www.genome.jp/tools/clustalw
	BRIG	http://brig.sourceforge.net/
Anotación	Prokka	https://github.com/tseemann/prokka
	RAST	http://rast.nmpdr.org
	Prodigal	https://github.com/hyattprodigal/prodigal/wiki
Mapeado	Bowtie	http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml
	BWA	http://bio-bwa.sourceforge.net/
Filogenia	FastTree	www.microbesonline.org/fasttree/
	SNPTree	www.genomicepidemiology.org
	iTOL	http://itol.embl.de/
Resistencia	ARDB	https://ardb.cbc.umd.edu
	CARD	https://card.mcmaster.ca
	ResFinder	https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/
	Abricate	https://github.com/tseemann/abricate
	ARG-ANNOT	http://www.mediterranean-infection.com/article.php?leref=282&titre=arg-annot
	PointFinder	https://bitbucket.org/genomicepidemiology/pointfinder

Acción	Programa	Sitio web
SNP	Samtools	www.htslib.org
	VarScan	http://dkoboldt.github.io/varscan/
	GATK	https://software.broadinstitute.org/gatk/
	Snippy	https://github.com/tseemann/snippy
Plásmidos	PlasmidFinder	https://cge.cbs.dtu.dk//services/PlasmidFinder/
	PlasmidSPAdes	http://cab.spbu.ru/software/plasmid-spades/
	PLACNETw	https://castillo.dicom.unican.es/upload/
	Plasmid MLST	https://pubmlst.org/plasmid/
Tipado	BIGSdb	http://bigsgdb.readthedocs.io
	Enterobase	https://enterobase.warwick.ac.uk
	MLST	http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/
Virulencia	VFDB	www.mgc.ac.cn/VFs
	VirulenceFinder	www.genomicepidemiology.org

ANEXO VII Genomas completos de las especies *Nocardia* spp. de las que se han publicado varios genomas basados en las técnicas de secuenciación masiva

Especie	Nº de genomas secuenciados (julio/2020)	Identificador de GenBank del genoma	Fecha de publicación del primer genoma
<i>Nocardia africana</i>	2	14540	01/04/2016
<i>Nocardia alba</i>	2	14836	01/04/2016
<i>Nocardia amikacinitolerans</i>	2	44425	01/04/2016
<i>Nocardia arizonensis</i>	2	44106	13/10/2015
<i>Nocardia arthritis</i>	2	14839	01/04/2016
<i>Nocardia asteroides</i>	4	14406	07/07/2012
<i>Nocardia brasiliensis</i>	7	12414	13/07/2012
<i>Nocardia caishijiensis</i>	2	14841	01/04/2016
<i>Nocardia carnea</i>	2	14476	13/07/2012
<i>Nocardia cerradoensis</i>	2	14477	13/07/2012
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	14	12184	07/02/2012
<i>Nocardia donostiensis</i>	3	52926	06/02/2017
<i>Nocardia farcinica</i>	9	1191	09/10/2004
<i>Nocardia ignorata</i>	2	14844	01/04/2016
<i>Nocardia lijiangensis</i>	2	14849	24/12/2015
<i>Nocardia mexicana</i>	2	14853	01/04/2016
<i>Nocardia neocaledoniensis</i>	2	14847	31/05/2018
<i>Nocardia nova</i>	9	14546	27/01/2014
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	4	14481	13/07/2012
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	3	14851	02/09/2015
<i>Nocardia puris</i>	2	14854	01/04/2016
<i>Nocardia rhamnosiphila</i>	3	14910	02/07/2014
<i>Nocardia salmonicida</i>	3	14547	01/04/2016
<i>Nocardia seriola</i>	17	14550	20/02/2014
<i>Nocardia</i> sp.	24	13538	23/04/2013
<i>Nocardia tenerifensis</i>	2	14485	13/07/2012
<i>Nocardia terpenica</i>	4	14487	13/07/2012
<i>Nocardia vulneris</i>	2	35990	29/12/2014

