

Diferenciación de especies de *Rhodococcus* mediante una prueba de PCR-RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16S ribosomal

Paula Pavía¹, Camila Calderon¹, Concepción Puerta Ph.D.¹

¹Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana.
Correspondencia: cpuerta@javeriana.edu.co

Recibido:11-08-05 / Aceptado:01-09-05

Resumen

Dada la dificultad en diferenciar las especies de *Rhodococcus* por pruebas bioquímicas, se desarrolló una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), seguida de un ensayo de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) para la diferenciación de las mismas. *R. equi*, *R. rhodnii* y otras bacterias fueron cultivadas en agar sangre y BHI a 37 y 26 °C. El ADN bacteriano fue extraído y amplificado con los iniciadores descritos por Hypsa y Dale. Los productos de amplificación fueron sometidos a digestión con diversas enzimas de restricción y los patrones de restricción obtenidos fueron confirmados mediante análisis *in silico*. Se obtuvo el fragmento de amplificación esperado de 1300 pb en todas las bacterias analizadas. Se pudo diferenciar *R. equi* de *R. rhodnii* con las endonucleasas *PstI* y *HindIII* y con respecto a otras bacterias con *PstI*, *HindIII*, *SstI*, *BamHI* y *EcoRI*. Los patrones de restricción obtenidos fueron confirmados mediante análisis *in silico*. La prueba PCR-RFLP constituye una alternativa para la diferenciación entre especies de *Rhodococcus* tales como *R. equi* y *R. rhodnii*.

Palabras clave: *Rhodococcus*, *R. equi*, *R. rhodnii*, PCR-RFLP.

Abstract

Considering the difficulty to differentiate the species of *Rhodococcus* by biochemical tests, a Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) has been developed to distinguish the species of the genus *Rhodococcus*. *R. equi*, *R. rhodnii* and other bacterial samples were cultured on Blood agar and BHI at 26 and 37°C. The obtained DNA was amplified with the primers described by Hypsa and Dale. Products of amplification were submitted to digestion with multiple restriction enzymes and the restriction patterns were confirmed by using *in silico* analysis. The expected amplification fragment of 1300 pb was obtained in all tested samples. *R. equi* was distinguished from *R. rhodnii* by using endonucleases such as *PstI* and *HindIII*, and from other bacteria with endonucleases *PstI*, *HindIII*, *SstI*, *BamHI* and *EcoRI*. The obtained restriction patterns were confirmed by using *in silico* analysis. This PCR-RFLP establishes an alternative for the differentiation among species of the genus *Rhodococcus* such as *R. equi* and *R. rhodnii*.

Key Words: *Rhodococcus*, *R. equi*, *R. rhodnii*, PCR-RFLP.

Introducción

El género *Rhodococcus* está conformado por más de 15 especies variables en morfología, características bioquímicas y carácter patógeno tanto para humanos como animales (1); siendo difícil la identifica-

ción de especie por los métodos tradicionales de coloración y de pruebas bioquímicas.

Dentro de estas especies, *Rhodococcus equi*, es el microorganismo más comúnmente asociado a diversas patologías en el hombre. La infección pulmonar es la forma clínica más frecuente en pacientes inmunocomprometidos (66-84%), mientras que en los individuos inmunocompetentes el porcentaje de infectados es menor (20-42%) (2). Más de 100 casos de infección por *R. equi* han sido reportados, comprendiendo no solo infecciones pulmonares, sino, infecciones con diferentes localizaciones que comprenden hasta el 50% de todos los casos (2, 3). Así mismo, esta bacteria es un patógeno importante de caballos, en los cuales causa neumonía granulomatosa y absceso de pulmón (3, 4).

Por otra parte, dentro del género *Rhodococcus* también se encuentran bacterias simbiotes de insectos, tales como *Rhodococcus rhodnii* (5) y *Rhodococcus triatomae* (6), microorganismos que han sido encontrados en el intestino de los insectos triatominos *Rhodnius prolixus* y *Triatoma spp.*, vectores transmisores de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas.

Otros actinomicetos tales como *Nocardia spp.*, *Gordonia spp.* y *R. equi*-“like”, han sido encontrados en el intestino de los triatominos *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* y *Panstrongylus megistus*, respectivamente (7). Las bacterias simbiotes son importantes para estos insectos ya que les suplen nutrientes como aminoácidos, vitaminas y ácidos nucleicos, importantes en la nutrición de los insectos (8). Por lo tanto, su identificación y diferenciación constituye el primer paso en el uso potencial de las mismas como vehículos para el control de la enfermedad de Chagas (9,10).

Para la identificación de *R. equi* y otras especies del género, en general la clínica del paciente, su situación inmunológica, el origen de la muestra, el tiempo de crecimiento de dicha bacteria, la morfología de la colonia y las características fenotípicas de la cepa,

pueden contribuir a realizar un diagnóstico presuntivo. En cuanto al diagnóstico diferencial, la prueba más clara es la producción de factor *Equi*. Sin embargo, la diferenciación definitiva entre las especies de *Rhodococcus* y otros actinomicetos presentes en muestras clínicas, no se facilita por pruebas microbiológicas convencionales. Es así como se han estudiado otras pruebas de identificación y diferenciación como son las moleculares (3). Dentro de este contexto, en este trabajo se desarrolló una prueba de PCR, seguida de un ensayo de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP), para diferenciar especies de *Rhodococcus* tomando como ejemplo las especies *R. equi* y *R. rhodnii*.

Materiales y métodos

Bacterias: se estudiaron las siguientes especies bacterianas: *R. rhodnii*, aislado en el laboratorio de Parasitología Molecular (PUJB), a partir del triatomo vector *R. prolixus* y, *R. equi* (CECT 555), cepa amablemente cedida por la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia, España. Dichas bacterias fueron cultivadas en medio BHI, agar sangre y agar *Corynebacterium* a 37 y 26 °C. También se utilizaron otras bacterias como *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumani*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Citrobacter* y *Moraxella*.

Extracción de ADN: para obtener el ADN de las bacterias se utilizó el método descrito por Shoemaker et al. (1986), con algunas modificaciones. Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos (min), a partir de un cultivo en medio BHI líquido. El botón bacteriano fue resuspendido en TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM, pH 8,0) y lavado dos veces en la misma solución. Luego, el botón bacteriano fue resuspendido en 200 µl de TE 1X y tratado con 2 mg/ml de lisozima e incubado a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se le adicionó SDS al 1% y 100 µg/ml de Proteinasa K e incubó a 65 °C por 4 horas (h). Tras adicionar 84 µl de NaCl 5 M y 60 µl de CTAB (bromuro de hexadecil-

trimetil amonio), la mezcla fue incubada a 65 °C durante 20 min. El ADN fue extraído con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) volumen a volumen (v:v) y precipitado con 0,6 volúmenes de isopropanol. Finalmente, la madeja de ADN obtenida se lavó con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente (TA) y se resuspendió en TE 1X. La concentración del ADN obtenido se midió por espectrofotometría a 260 nm (12).

Condiciones de la reacción de PCR: el ADN bacteriano fue amplificado con los iniciadores:

16F (5'-GCTTAACACATGCAAG-3') y

16R (5'-ACGGGCAGTGTGTACAAGACC-3'), correspondientes a las posiciones 45 a 61 y 1406 a 1386, respectivamente, del gen codificante para el ARN ribosomal 16S de *E. coli* (13). La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, según lo descrito por Hypsa y Dale, (1997) y el producto de amplificación fue visualizado mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% coloreados con bromuro de etidio (12).

PCR-RFLP: los productos de amplificación obtenidos con cada una de las bacterias, fueron sometidos a digestión con diferentes endonucleasas según especificaciones de la casa comercial para cada enzima. Los perfiles de restricción obtenidos fueron

visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% coloreados con bromuro de etidio (12).

Análisis in silico: se determinó mediante el programa TACG versión 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>) el patrón de restricción diferencial del gen 16S ARNr de *R. equi*, *R. rhodnii* y de 14 especies de *Rhodococcus*, 3 de *Nocardia* y 1 de *Tsukamurella*.

Resultados

Ensayo de PCR 16S F/R

Una vez obtenido el ADN de *R. equi*, *R. rhodnii* y *E. coli*, este fue amplificado con los iniciadores conservados para los genes 16S ARNr, obteniendo el producto de amplificación esperado de 1361 pb, Figura 1. Este mismo ensayo de PCR, se realizó con un número mayor de bacterias, obteniendo de igual forma el producto de amplificación esperado, Figura 2.

Ensayos de PCR-RFLP

A partir de la digestión de los productos de amplificación de las bacterias estudiadas con enzimas de restricción, se logró determinar el patrón de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y otros

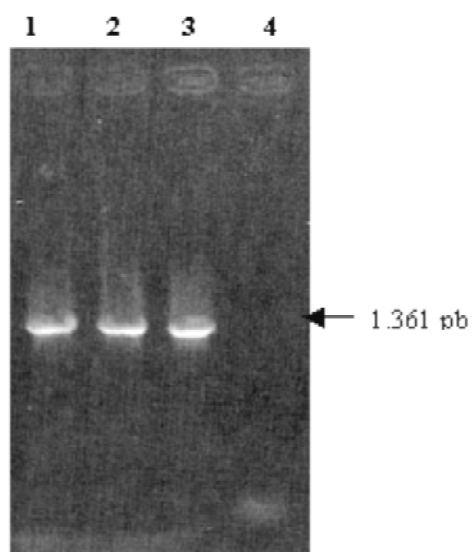


Figura 1. Resultados de la PCR 16SF/R No. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10 µl del producto amplificado. *R. equi* (1), *R. rhodnii* (2), *E. coli* (3) y en el control negativo se usó agua destilada como templado (4).

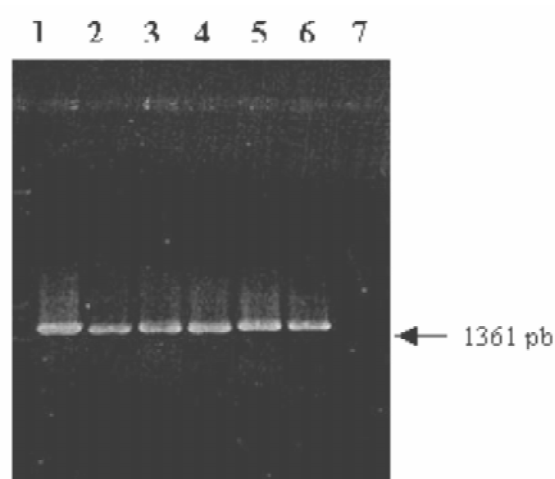


Figura 2. Resultados de la PCR 16SF/R No. 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10 µl del producto amplificado. *Salmonella* (1), *Klebsiella* (2), *Acinetobacter* (3), *Lactobacillus* (4), *Citrobacter* (5), *Moraxella* (6) y en el control negativo se usó agua destilada como templado (7).

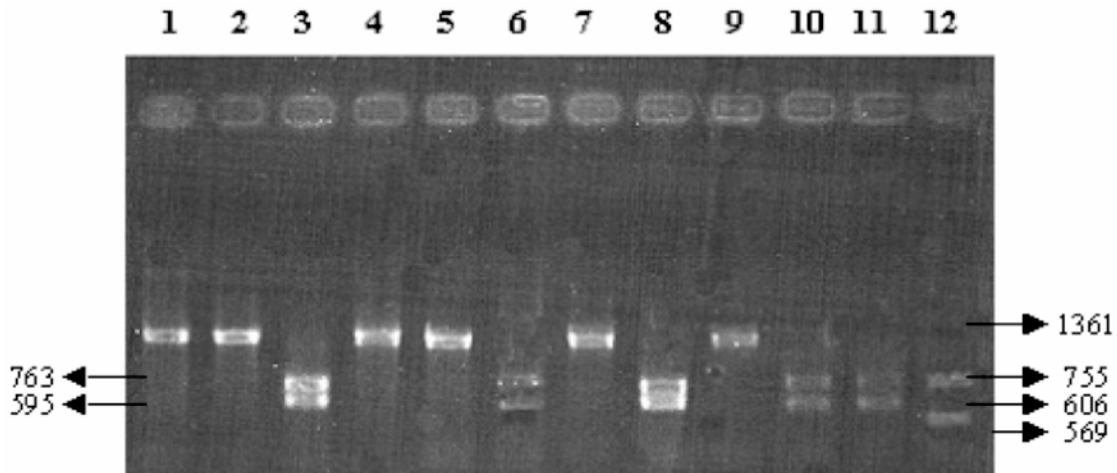


Figura 3. Resultados del perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y *E. coli*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 15 µl del producto de digestión. *E. coli* sin digerir (1), perfil de restricción para *E. coli*: *Bam*HI (2), *Hind*III (3) y *Pst*I (4), *R. rhodnii* sin digerir (5), perfil de restricción para *R. rhodnii*: *Bam*HI (6), *Hind*III (7) y *Pst*I (8), *R. equi* sin digerir (9), perfil de restricción para *R. equi*: *Bam*HI (10), *Hind*III (11) y *Pst*I (12). Los tamaños de los fragmentos se indican en pb.

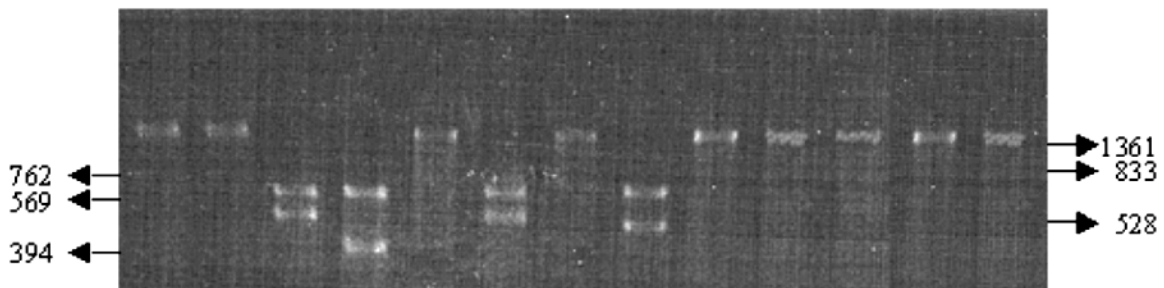


Figura 4. Resultados del perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y otros cocobacilos. Electroforesis en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 15 µl del producto de digestión. *E. coli* sin digerir (1), perfil de restricción con la enzima *Pst*I para: *E. coli* (2), *R. rhodnii*, (3), *R. equi* (4) y *A. baumani* (5), perfil de restricción con la enzima *Hind*III para: *E. coli* (6), *R. rhodnii*, (7), *R. equi* (8) y *A. baumani* (9), perfil de restricción con la enzima *Bst*EII para: *E. coli* (10), *R. rhodnii*, (11), *R. equi* (12) y *A. baumani* (13). Los tamaños de los fragmentos se indican en pb.

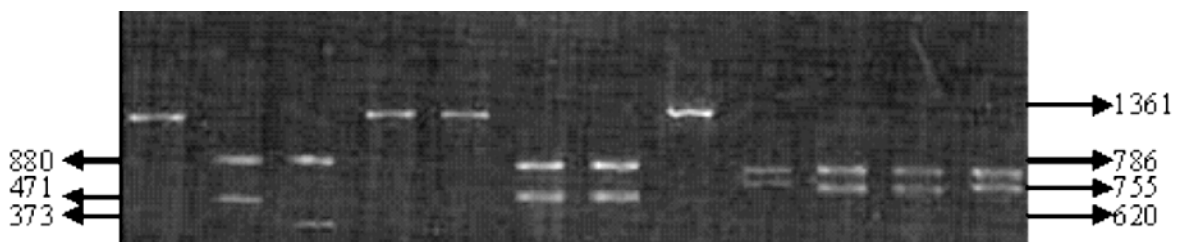


Figura 5. Resultados del perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y otros cocobacilos. Electroforesis en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio conteniendo 15 µl del producto de digestión. Perfil de restricción con la enzima *Sst*I para: *E. coli* (2), *R. rhodnii*, (3), *R. equi* (4) y *A. baumani* (5), perfil de restricción con la enzima *Bam*HI para: *E. coli* (6), *R. rhodnii*, (7), *R. equi* (8) y *A. baumani* (9), perfil de restricción con la enzima *Eco*RI para: *E. coli* (10), *R. rhodnii*, (11), *R. equi* (12) y *A. baumani* (13). Los tamaños de los fragmentos se indican en pb.

Tabla 1. Perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y *E. coli*

	BamHI	HindIII	PstI
<i>R. equi</i>	755	833	797
	606	852	170
			394
<i>R. rhodnii</i>	755	-	792
	606		569
<i>E. coli</i>	-	766	-
		595	

Tabla 2. Perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y otros cocobacilos.

	PstI	HindIII	BstEII	SstI	BamHI	EcoRI
<i>R. rhodnii</i>	792	-	-	880	755	786
	569			481	606	580
<i>R. equi</i>	797	833	-	880	755	786
	394	528		373	606	575
	170			107		
<i>E. coli</i>	-	766	-	-	-	786
		595				575
<i>A. baumani</i>	-	-		-	-	740
						620

cocobacilos con las enzimas *BamHI*, *HindIII*, *PstI*, *SstI*, y *EcoRI*, Tablas 1 y 2 y Figuras 3-5.

PCR-RFLP *in silico*

Se logró determinar por análisis *in silico* un algoritmo de diferenciación entre *R. equi* y *R. rhodnii* y entre estas dos especies y otras especies de *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Tsukamurella*, Tablas 3-5. Los resultados obtenidos confirman los hallazgos experimentales.

Discusión

La PCR, seguida de un ensayo de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) propuesta en este trabajo, es una prueba alternativa para la diferenciación entre distintas especies de *Rhodococcus*. Esta prueba combina la ventaja de la elevada conservación de la secuencia de nucleótidos de los genes ribosomales 16S entre distintos géneros bacterianos, con la especificidad de los polimorfismos de restricción, los cuales evidencian la

variabilidad entre las secuencias amplificadas permitiendo la identificación a nivel de especie.

Con esta prueba se pudo determinar un perfil de restricción diferencial entre *R. equi*, *R. rhodnii* y otros cocobacilos. Debido al pleomorfismo y variabilidad que presentan las especies de *Rhodococcus* con ciertos colorantes, pueden ser confundidos con micobacterias de crecimiento rápido o con el género *Acinetobacter* (3). Es así como, en este trabajo se incluyó en el análisis otras especies bacterianas como *Acinetobacter baumani* y *Escherichia coli*, obteniéndose un patrón diferencial de estas especies con respecto a *R. equi* y *R. rhodnii*. El análisis de PCR-RFLP *in silico* permitió confirmar los anteriores resultados, así como también diferenciar estas bacterias de otras especies de *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Tsukamurella*, las cuales también pueden ser aisladas a partir de diferentes muestras clínicas (2, 3).

Por otra parte, la PCR-RFLP, mostró ser una herramienta valiosa para la identificación y

Tabla 3. Algoritmo de diferenciación de *R. equi* y *R. rhodnii* con otros *Rhodococcus*

	HindIII	PstI	KpnI	SstI
<i>R. rhodnii</i>	-	792,569	972	880, 481
<i>R. equi</i>	833,52	797,394, 170	972	880, 373, 107
<i>R. zopfii</i>	-	797, 394,170	970	877, 484
<i>R. ruber</i>	-	793,578	-	867, 494
<i>R. coprophilus</i>	-	418,170,312,421	-	-
<i>R. rhodochrous</i>	-	407,170,312,432	959,402	867, 494
<i>R. pyridinovorans</i>	-	567, 355,442	-	877, 484
<i>N. paucivorans</i>	-	556.352,453	980	-
<i>N. asterioides</i>	-	922,439	972	-
<i>N. farcinica</i>	528,83	564,352,445	972	-

Tabla 4. Algoritmo de diferenciación de *R. equi* y *R. rhodnii* con otros *Rhodococcus*

	HindIII	PstI	KpnI	SstI
<i>R. rhodnii</i>	-	-	972, 389	880, 481
<i>R. erythreus</i>	1128, 233	-	962, 399	-
<i>R. erythropolis</i>	1128, 233	-	962, 399	-
<i>R. fascians</i>	1147, 214	68,1293	981, 380	-
<i>R. marinonascens</i>	1128,233	-	962,339	-
<i>R. opacus</i>	1128,233	-	962, 339	868,523
<i>R. koreensis</i>	1128,233	-	962,399	-
<i>R. percolatus</i>	1126, 224	-	962, 339	818,543
<i>R. globerulus</i>	1128,233	-	962, 399	-
<i>Tsukamurella</i>	1138,233	-	972, 389	881,480

diferenciación de *R. rhodnii*, bacteria simbiote en el insecto triatomino *R. prolixus*, vector transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (5-10). Por lo tanto, esta

prueba puede ser utilizada en la búsqueda, identificación y diferenciación de bacterias simbiotes en otras especies de triatominos.

Tabla 5. Algoritmo de diferenciación de *R. equi* y *R. rhodnii* con otros *Rhodococcus*

	BstEII	HindIII	PstI	SstI
<i>R. equi</i>	-	833 528	797,394 170	830 373, 107
<i>R. erythropolis</i>	1128 233	-	401,170, 351, 439	-
<i>R. fascians</i>	1147 214	68 1239	385 1021	-
<i>R. rhodochrous</i>	-	-	407, 170 352, 432	867 484

Adicionalmente, diferentes especies de *Rhodococcus* se han considerado de gran importancia porque son utilizadas a nivel de control ambiental y en la industria biotecnológica (14). Uno de los ejemplos es el uso de *R. rhodochrous* en la producción de acrilamida a nivel industrial (15). Teniendo en cuenta lo anterior, la prueba de PCR-RLFP propuesta en este trabajo puede resultar de gran ayuda en la identificación de las diferentes especies utilizadas a nivel industrial.

Finalmente, se recomienda aplicar este ensayo a partir de muestras biológicas y evaluar su aplicabilidad con las diferentes especies de *Rhodococcus* aisladas de muestras clínicas y ambientales.

Agradecimientos

A la Dra. Alba Alicia Trespalacios, directora del Cepario y del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana, por su asesoría en la identificación bioquímica de los microorganismos estudiados y por facilitar la cepa ATCC de *Rhodococcus equi*.

Referencias

- Murria P, Rosenthal K, Kobayashi G. *Nocardia*, *Rhodococcus* and related *Actinomycetes*. En: Medical Microbiology, Tercera edición, Editorial Mosby, USA 1998.
- Kedlaya I, Ing MB, Wong SS. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. Clin Infect Dis 2001; 32: 39-46.
- Weinstock DM, Brown AE. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clin Infect Dis 2002; 34:1379-1385.
- Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 20-34.
- Hill P, Campbell JA, Petrie LA. *Rhodnius prolixus* and its symbiotic actinomycete: a microbiological, physiological and behavioural study. Proc R Soc Lond B, Biol Sci Sp 1976; 194: 501-525.
- Yassin AF. *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55: 1575-1579.
- Eichler S, Schaub, GA. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. Exp Parasitol 2002; 100: 17-27.
- Beard C, Cordon-Rosales C, Durvasula R. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. Annu Rev Entomol 2002; 47: 123-141.
- Beard C, Mason P, Aksoy S, Tesh R, Richards F. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 195-200.
- Dotson EM, Plikaytis B, Shinnick TM, Durvasula RV, Beard CB. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. Infect Genet Evol 2003; 3: 103-109.
- Shoemaker SA, Fisher JH, Jones WD Jr, Scoggin CH. Restriction fragment analysis of chromosomal DNA defines different strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Am Rev Respir Dis 1986; 134: 210-213.
- Sambrook JF, Russell DW. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.
- Hypsa V, Dale C. In vitro culture and phylogenetic analysis of "*Candidatus Arsenophonus triatominarum*" an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 1140-1144.
- Bell KS, Philp JC, Aw DW. The genus *Rhodococcus*. J Appl Microbiol 1998; 85: 195-210.
- Yamada H, Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. Biosci Biotechnol Biochem 1996; 60: 1391-1400.