



" DETERMINACION " IN VITRO DEL EFECTO DE LA COMBINACION
DE AMIKACINA Y TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL
SOBRE NOCARDIA BRASILIENSIS

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA:

CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

MONTERREY, N. L.

OCTUBRE DE 1994

TM

Z6658

FM

1994

E8



1020091285



**"DETERMINACION *In vitro* DEL EFECTO DE LA COMBINACION
DE AMIKACINA Y TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL
SOBRE *Nocardia brasiliensis*.**

POR

CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA

DE LA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

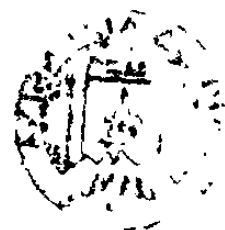
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

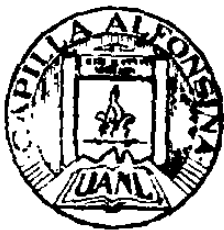
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

Monterrey, N.L.

Octubre de 1994.



TM
26658
FM
1994
E8



FONDO TESIS

166818



**DETERMINACION *In vitro* DEL EFECTO DE LA COMBINACION DE
AMIKACINA Y TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL
SOBRE *Nocardia brasiliensis*.**

por

CLAUDIA ESCUDERO LOURDES

COMISION DE TESIS

NOMBRE

FIRMA

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Manuel A. Rodriguez Quintanilla'.

DR. OLIVERIO WELSH LOZANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Oliverio Welsh Lozano'.

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Herminia G. Martinez Rodriguez'.

M.C. MA. ALICIA SUAREZ SEMOUR

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ma. Alicia Suarez Semour'.

M.C. IRMA ALICIA SALINAS GONZALEZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irma Alicia Salinas Gonzalez'.

*A mi Esposo Alfonso por todo su amor, su apoyo y
su paciencia.*

*A mi niña Claudia Alejandra por ser mi más
grande ilusión y mi aliciente, por las
horas que he sacrificado
sin estar a su lado.*

*A mi madre, por enseñarme siempre el camino del
éxito y la perseverancia, por depositar
toda su fe en mi.*

*A mi hermana, por darme siempre aliento para
continuar en el camino, por
todo su cariño.*

*A la memoria de mi abuela Eloisa
por haberme enseñado mucho
de lo que ahora soy,
la recuerdo con inmenso
Amor.*

A toda mi familia a quien Amo con toda mi alma

Agradezco profundamente a Dios por haberme dado la oportunidad
de realizarme como Profesionista, como esposa
y como madre

Especialmente agradezco a mi Asesor Dr. Manuel Rodríguez
Quintanilla, a mis co-asesores : Dr. Oliverio Welsh
Lozano y Lucio Vera Cabrera.

De manera muy especial agradezco al Dr. Roberto Leyva Ramos,
director de la Facultad de Ciencias Químicas, por todo
su confianza y su apoyo.

Con mi admiración y cariño agradezco de manera muy especial
a la Dra. Herminia G. Martínez por su enorme apoyo, y
por todas las horas dedicadas en la corrección
de este trabajo.

Agradezco Igualmente con todo cariño a todos mis maestros
del Postgrado, por haberme legado sus conocimientos;
por todo su cariño y apoyo.

A mi amigo y asesor Dr. Fidel Salazar González agradezco con
cariño toda su ayuda y la confianza depositada en mí.

Con mucho cariño agradezco el apoyo de todos mis amigos para
que continuara con mi vocación.

Agradezco de todo corazón a mi amiga Marcela Cuevas Lara,
por su ayuda incondicional en la realización
de esta tesis.

¡GRACIAS!

INDICE

	PÁGINA
<i>TABLA DE ABREVIATURAS</i>	7
<i>INTRODUCCION</i>	8
<i>HIPOTESIS</i>	17
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	18
<i>MATERIAL Y METODOS</i>	
<i>Recuperación de las cepas y preparación de las suspensiones bacterianas</i>	19
<i>Determinación de la CMI para Amikacina y Trimetoprim-sulfametoxazol en cepas de Nocardia brasiliensis</i>	20
<i>Determinación del efecto de la combinación de Amikacina y trimetoprim- Sulfametoxazol</i>	22
<i>Curva de muerte bacteriana</i>	23
<i>RESULTADOS</i>	
<i>Determinación de la CMI para Amikacina y TMP-SMZ</i>	27
<i>Determinación del efecto de la combinación de Amikacina y TMP-SMZ</i>	28
<i>Isobologramas</i>	32
<i>Curva de muerte bacteriana</i>	40
<i>DISCUSION</i>	52
<i>CONCLUSIONES</i>	57
<i>RESUMEN</i>	59
<i>REFERENCIAS</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADPH-3	Aminoglicósido Aminotrasferasa
APG	Acido Pteroil-glutámico
AK-T.S	Amikacina-Trimetoprim/Sulfametoxazol
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DDS	Diamino Dimetil Sulfóxido
PABA	Acido Para-amino benzoico
RNA_m	Acido Ribonucleico mensajero
RNA_t	Acido Ribonucleico de transferencia
SSE	Solución Salina Estéril
TMP-SMZ	Trimetoprim-Sulfametoxazol
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

***DETERMINACION In vitro DEL EFECTO DE LA COMBINACION DE AMIKACINA
Y TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL SOBRE Nocardia brasiliensis***

INTRODUCCION

Nocardia brasiliensis es un actinomiceto aerobio, actualmente situado en la sección 26 (Nocardioform Actinomycetes) de la clasificación oficial de Bergey (1) presenta propiedades similares a las de un hongo verdadero: forma filamentos microsifonados y tabicados que se fragmentan produciendo bacilos irregulares y células cocoides. Es un organismo grampositivo y parcialmente ácido alcohol resistente. Crece dando colonias blancas o naranjas de forma acuminada o surcada dando el aspecto de una "palomita de maíz". Es el agente etiológico de más del 90% de los micetomas en México (2,3).

El micetoma es un síndrome anatomoclínico de lesiones localizadas, generalmente no dolorosas, deformantes y fistulizadas, de donde drena un exudado filante que contiene las formas parasitarias denominadas "granos", que son masas compactas de micelio. La triada de tumefacción, senos drenantes y granos, es usada para definir el término micetoma.

Los agentes etiológicos del micetoma son diversos actinomicetos aerobios, en cuyo caso es llamado micetoma actinomicético; y hongos verdaderos, denominándose micetoma eumicético.

Dentro de los actinomicetos productores de micetoma se encuentra además de *Nocardia brasiliensis*, a *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitis-caviarum*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y *Pseudoallescheria boydii*, *Acremonium sp.* En los eumicetos, *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea*, *Leptosphaeria tompkinsii*, *Piranochaeta romeroi*, son los agentes causales más frecuentes.

Los granos formados por cada uno de estos agentes, pueden ser microscópicos como los de *Nocardia*, o ser visibles a simple vista como los de *Actinomadura madurae* y los eumicéticos. observándose diferencias en tamaño, color y forma, características que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de la especie.

El micetoma se presenta en zonas geográficas definidas: por lo general comprendidas cerca del trópico de Cáncer, donde existen los climas subtropical y tropical y una precipitación pluvial anual entre 500 y 1,000 mm y rangos de temperatura entre 10-20°C y 20-40°C , que constituyen las condiciones climatológicas necesarias para el desarrollo de los agentes etiológicos (2,3). A nivel mundial Sudán parece tener el más alto número de pacientes con esta enfermedad, seguido de Senegal, Nigeria, Chad y Níger; en Asia se presenta principalmente en toda la India, y en el Continente Americano se ha reportado en varios países, predominando en México, Venezuela, Brasil, Argentina y el Salvador (2-4). En México, la ciudad de Monterrey , Nuevo León ocupa el primer lugar en incidencia, seguida de los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Zacatecas y el Distrito Federal (3).

Todos los agentes causantes de micetoma son saprofitos o patógenos de plantas que se encuentran en desechos vegetales , espinas, etc., en especial se han relacionado con las espinas de las acacias, y introduciéndose a la dermis a través de abrasión o punturas. Se ha observado que afecta principalmente a adultos jóvenes masculinos, esto probablemente por razones ocupacionales, siendo por ello el campesino el individuo más frecuentemente afectado.

La mayor parte de los casos se presentan principalmente en el pie, seguido de la pierna, rodillas, huecos poplíteos, muslo, cadera, nalgas, area genital e inclusive en la región perianal, esta última forma, quizá por la costumbre que tienen ciertas personas de realizar la limpieza anal con vegetales. La segunda localización en frecuencia es en espalda y la nuca, seguida por los miembros superiores, también se han reportado en tórax, escroto, vulva, cara y cráneo, esta última presentación tiene un mal pronóstico (3).

La tendencia a afectar al hueso subyacente depende del agente etiológico, tendiendo por lo regular a destruir los huesos pequeños , como las falanges metatarsianas, huesos del carpo, rótulas, vértebras, etc. Los agentes actinomicéticos tienen mayor tendencia a diseminarse y provocar lesiones secundarias y esto es particularmente cierto para *Nocardia brasiliensis*.

En trabajos previos se ha reportado la deficiencia en la inmunidad de tipo celular en los pacientes con diagnóstico de micetoma (5,6) , pero en un trabajo recientemente publicado por Fung-Bonifáz, se ha demostrado que el estado inmune del paciente con micetoma actinomicético, prácticamente es similar al de individuos sanos (7).

Aunque el micetoma no es una causa de alta mortalidad, ni es un problema de salud pública, es de suma importancia por la invalidez que puede generar en el miembro que afecta. Por ello es importante que el agente causal del micetoma sea determinado para iniciar un tratamiento específico. Entre los agentes antifúngicos que se emplean en la quimioterapia del micetoma eumicótico, se encuentran la anfotericina B y los imidazoles. El actinomicetoma es más fácil de tratar que el eumicetoma, sin embargo, el tratamiento se hace difícil por la incapacidad de las drogas para penetrar a áreas fibrosas en concentración suficiente para inhibir a la bacteria. Por esta razón el tratamiento del micetoma actinomicético varía actualmente de tres meses hasta varios años.

En el micetoma actinomicético se han usado como tratamiento las sulfas, como la sulfanilamida, el Diamino dimetil sulfóxido (DDS) solo o en combinación con otros antimicrobianos; el sulfisoxazol , la sulfametoxipiridazina, el sulfametoxazol combinado con trimetoprim ;las tetraciclinas se han utilizado ocasionalmente, principalmente la oxitetraciclina y la minociclina. La estreptomina se ha usado en combinación con DDS , trimetoprim-sulfametoxazol y también con rifampicina

Drogas antituberculosas como la isoniazida y la rifampicina, han sido también utilizadas con éxito variable (9-19). La amikacina se ha utilizado con excelentes resultados.

Durante el tratamiento del actinomicetoma, diversas cepas se han encontrado

resistentes al tratamiento convencional, y siendo *Nocardia* el agente etiológico de la mayor parte de los micetomas actinomicéticos en nuestro país, es importante mencionar que se han probado numerosas drogas y sus combinaciones tanto *In vivo* como *In vitro* contra esta bacteria (37-41).

La mayoría de los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos realizados sobre el género *Nocardia* se han llevado a cabo en *Nocardia asteroides*, aislada de pacientes con abscesos nocardiosicos de pulmón, pero pocos estudios han sido descritos sobre susceptibilidad de *Nocardia brasiliensis* obtenida de actinomicetomas.

De acuerdo a estos reportes, el género *Nocardia* presenta muy poca susceptibilidad *In vitro* a las penicilinas y cefalosporinas (26,29) y una susceptibilidad variable a los aminoglicósidos (27,28); es muy susceptible a los análogos de las tetraciclinas, principalmente a la minociclina (31-34). Se ha reportado también que la combinación *In vitro* de eritromicina con ampicilina tiene un efecto inhibidor sinérgico (20).

Nocardia presenta una alta susceptibilidad a diversas cefalosporinas (24) a ciprofloxacina-imipenem y ácido fusídico (22). Varias cepas se han encontrado resistentes a la combinación *In vitro* de trimetoprim y sulfametoxazol (31). Una carboxiquinolona denominada PD 117558 es sumamente activa contra el género *Nocardia* (36). Varios reportes de estudio de susceptibilidad a antimicrobianos del género *Nocardia* coinciden en indicar que amikacina tiene una actividad muy alta *In vitro* a concentraciones muy pequeñas, contra aproximadamente el 90% de las cepas probadas de *Nocardia* (21-23,25,30).

En 1983 se reportó el estudio *In vitro* de las actividades de Amikacina e Imipenem combinados con otros antibióticos, incluyendo Trimetoprim-Sulfametoxazol, en 26 cepas de

En 1983 se reportó el estudio *In vitro* de las actividades de Amikacina e Imipenem combinados con otros antibióticos, incluyendo Trimetoprim-Sulfametoxazol, en 26 cepas de *Nocardia asteroides*, donde se observó sinergismo en el 83% de las cepas probadas para la combinación Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol (28).

Welsh y cols. reportaron el uso de la combinación de amikacina con Trimetoprim-sulfametoxazol, y solamente con amikacina, en el tratamiento de pacientes con diagnóstico de micetoma actinomicético causado por *Nocardia brasiliensis* que habían tenido una pobre respuesta a la terapia tradicionalmente usada, y que tenían un alto riesgo de diseminación a órganos importantes, observándose la remisión clínica y bacteriológica de todos los pacientes tratados en 1 a 3 ciclos de tratamiento, correspondiendo a 5 semanas de duración para cada ciclo (35).

El Trimetoprim, el Sulfametoxazol y la Amikacina, actúan a diferentes niveles sobre el metabolismo bacteriano alterando su viabilidad. Las sulfonamidas actúan antagonizando competitivamente al ácido para-aminobenzoico (PABA) impidiendo así la utilización normal de PABA por la bacteria, inhibiendo su desarrollo al impedir que el PABA sea incorporado a la molécula del ácido pteroilglutámico (APG),(43).

Los organismos sensibles son aquellos que deben sintetizar su propio APG , en tanto que las bacterias que no necesitan de este ácido o que pueden utilizar ácido pteroilglutámico preformado no son afectadas por las sulfonamidas . Aunque estos agentes inhiben inmediatamente la síntesis de APG , su efecto sobre las bacterias no se manifiesta hasta que ha transcurrido un lapso que corresponde a varias divisiones celulares, se supone que en este tiempo se agota el APG almacenado (42-44).

Por otra parte el Trimetoprim una diaminopirimidina, es un inhibidor poderoso y selectivo de la dihidrofolato reductasa microbiana, enzima que reduce el dihidrofolato a tetrahidrofolato; es esta forma reducida del ácido fólico la necesaria para reacciones de transferencia de carbono, actuando con un efecto superaditivo al combinarse con el Sulfametoxazol; por lo tanto, la actividad antimicrobiana de la combinación del trimetoprim y el Sulfametoxazol resulta de sus interacciones en dos etapas sucesivas de la vía enzimática para la síntesis de tetrahidrofolato; la sulfonamida inhibiendo la incorporación de PABA en el ácido fólico y el Trimetoprim inhibiendo la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, esencial para la transferencia de carbono, en especial en la síntesis de timidilato a partir de desoxiuridilato (42).

La Amikacina es un antimicrobiano aminoglucósido semisintético, derivado de la Kanamicina. Los aminoglucósidos consisten en dos o más aminoazúcares unidos por enlace glucosídico a un núcleo de hexosa o aminociclitol, generalmente central. Esta hexosa o aminociclitol es estreptidina, característica de todos los aminoglucósidos. Las familias de los aminoglucósidos se distinguen por los aminoazúcares unidos al aminociclitol.

En la familia de la Kanamicina que incluye Kanamicina A y B, amikacina y tobramicina, dos aminoazúcares se unen a una estreptamina. (44).

Los aminoglucósidos actúan sobre la síntesis de proteínas , a nivel de la subunidad pequeña del ribosoma (43). La subunidad pequeña del ribosoma consta de 21 moléculas proteicas de diferentes pesos moleculares que oscilan entre los 10,700 y 65,000 d , las cuales se han designado como S1 a S21. Los aminoglucósidos se asocian irreversiblemente a la proteína S12 y a otras como S3, S5, S9, S14 y S10; este es primer paso de la inhibición, luego el aminoglucósido bloquea la actividad normal del complejo de iniciación de la formación del péptido (RNAm -formilmetionina-RNAt); a continuación el RNAm es traducido mal sobre la "región de reconocimiento" del ribosoma y como resultado se inserta un aminoácido equivocado en el interior del péptido produciéndose una proteína no funcional (45-47). La inserción del aminoglucósido en la subunidad pequeña del ribosoma, resulta en la demolición de los polisomas y su separación en monosomas, incapaces de llevar a cabo la síntesis proteica. Estas actividades ocurren más o menos simultáneamente y el efecto global es por lo general un evento irreversible que destruye a la célula bacteriana.

Los antimicrobianos antes mencionados, son potencialmente tóxicos, y entre los efectos secundarios relativos al uso de las Sulfonamidas se encuentran la fiebre medicamentosa y los efectos sobre la sangre, médula ósea, riñones, hígado, piel y nervios periféricos. Los aminoglicósidos son potencialmente oto y nefrotóxicos con efectos generalmente irreversibles (43); por ello, entre las razones técnicas del uso de la terapia por combinaciones se encuentra, no sólo el encontrar finalmente, un efecto bactericida sino también la disminución de la toxicidad secundaria al reducir la dosis.

Dado el hecho de que se presenta una completa remisión tanto clínica como bacteriológica en los pacientes con micetoma actinomicético causado por *Nocardia brasiliensis* al ser tratados con la combinación de Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol (35), y debido a que ya ha sido demostrado previamente un efecto sinérgico de esta combinación sobre cepas de *Nocardia asteroides* aisladas de pacientes con nocardiosis pulmonar (28), se deduce que es posible que la combinación de estos antimicrobianos *In vitro*, resulte en un efecto superaditivo (sinérgico) de los efectos inhibitorios individuales, cuando se prueban sobre *Nocardia brasiliensis*.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Existe un efecto inhibitorio de tipo sinérgico entre los antimicrobianos Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol cuando actúan combinados sobre cepas susceptibles de *Nocardia brasiliensis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la susceptibilidad de diferentes cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes con diagnóstico de micetoma actinomicético ,frente a Amikacina y a Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ).
- 2.- Medir el efecto inhibitorio de la combinación *In vitro* de ambos antimicrobianos en distintas proporciones sobre la viabilidad de *Nocardia brasiliensis*.
- 3.- Determinar el efecto de la combinación de estos antimicrobianos en la cinética de una curva de Muerte bacteriana de una suspensión de *Nocardia brasiliensis*.

MATERIAL Y METODOS

1.- Recuperación de las cepas y preparación de las suspensiones bacterianas.

Las cepas de *Nocardia brasiliensis* utilizadas para este estudio fueron aisladas en el Departamento de Microbiología, área Micología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de micetoma actinomicético que asistieron a consulta al departamento de Dermatología del Hospital "Dr. José Eleuterio González", e identificadas como *Nocardia brasiliensis* basándose en las características de crecimiento y tinción y la habilidad del organismo para hidrolizar caseína y tirosina y licuar la gelatina. Todas las cepas se conservaron en agar Sabouraud con aceite mineral para su posterior estudio.

Se sembró una asada del crecimiento bacteriano del cultivo en 5 ml de caldo BHI que contenía perlas de vidrio de 0.5 mm y se mantuvo a 37⁰C durante 72 hrs mezclando en el vortex diariamente por espacio de 30 segundos. Con hisopos estériles cada una de las cepas fue resembrada a botellas que contenían agar Sabouraud inclinado y se incubaron a 37⁰C hasta que se observó un denso desarrollo en la superficie del agar.

Cada cepa entonces fue resembrada a tubos con 5ml de caldo Mueller-Hinton con 0.02% de tween 80 como agente surfactante y perlas de vidrio de 0.5mm de diámetro y se incubaron a 37⁰C en agitación continua , agitando en vortex diariamente 2 o 3 veces por espacio de 30 segundos cada cepa para favorecer la obtención de suspensiones celulares. Transcurridas 72 hrs de cultivo, las cepas fueron resembradas a tubos con 5 ml de caldo

Mueller-Hinton fresco con 0.02% de tween 80 y perlas de vidrio de 0.5mm de diámetro, los cultivos se mantuvieron a 37⁰C en agitación continua por espacio de 72 hrs , agitando 2 a 3 veces cada cultivo en un vortex por 30 segundos. Las suspensiones obtenidas contenían fragmentos grandes que fueron descartados centrifugando cada cultivo a 900 g y tomando el sobrenadante que se lavó con solución salina estéril en una ocasión y luego fue resuspendido en solución salina estéril. Esta fue la suspensión de trabajo de cada una de las cepas (20,28,48,49,51).

2.- Determinación de la CMI para Amikacina y Trimetoprim Sulfametoxazol en cepas de *Nocardia brasiliensis*.

I.- Preparación de los antibióticos.

Se preparó una solución stock de cada antibiótico, para ello fue tomada en cuenta la actividad antimicrobiana que se indica en cada lote. La Amikacina se disuelve fácilmente en agua tridestilada a temperatura ambiente. El Trimetoprim y el Sulfametoxazol se prepararon en una proporción de 1:5 respectivamente, disolviéndose en 5 ml de Dimetil Sulfoxido.

II.- Preparación de los medios de cultivo con antibióticos.

A partir de la solución stock de cada uno de los antimicrobianos se realizaron diluciones seriadas 1:2 para obtener el rango de concentraciones deseadas para cada antimicrobiano. El rango de concentraciones finales (en el agar) utilizadas para amikacina fue de 0.25ug/ml-32ug/ml (22) y para Trimetoprim-Sulfametoaxol (1:5) es de 1.6ug/ml-200ug/ml (20). Los puntos de corte son los recomendados por NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standars ,1985).

La cantidad de agar necesaria para realizar triplicados de cada dilución de antimicrobianos se distribuyó en matraces, y se esterilizó en autoclave; una vez que se llegó a una temperatura apropiada cada dilución de los antibióticos contenida en 5 ml de caldo Mueller-Hinton fue añadida al agar contenido en los matraces, en cantidad apropiada para obtener la concentración final deseada (técnica estandarizada en el Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. U.A.N.L).

El contenido de cada matraz se distribuyó en tres placas y se permitió que solidificara.

III.- Preparación de las suspensiones de *Nocardia brasiliensis* e inoculación sobre las placas conteniendo los antimicrobianos.

Las suspensiones obtenidas anteriormente de todas las cepas de *Nocardia brasiliensis* fueron llevadas a primera transparencia en solución salina estéril tomando como referencia el Nefelómetro de Mc-Farland # 0.5 , que corresponde a 1×10^8 UFC/ml. Cada una de las cepas fue colocada en un pozo apropiado de la placa contendora del replicador de Steers previamente esterilizada al horno, y luego el inóculo fue tomado con la placa replicadora y transferida a la superficie del agar conteniendo la dilución del antimicrobiano correspondiente. Se inocularon placas control (sin antimicrobiano) para cada serie de diluciones (48). Una vez inoculadas las placas fueron mantenidas a 37⁰C hasta por 5 días para observar los resultados.

Escherichia coli ATCC 25922 fue incluida como control.

3.-Determinación del efecto de la combinación de Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Una vez obtenida la CMI para cada cepa , se usaron como referencia para determinar el rango de concentraciones que será usado para realizar todas las combinaciones posibles de los antimicrobianos.

El esquema formado por cada una de las combinaciones posibles de los antimicrobianos se denomina " Patrón Cruzado de Concentraciones", (Chequerboard) (50,52).

La preparación de .las placas conteniendo cada una de estas combinaciones de los antibióticos se llevó acabo de la misma manera en que se hizo para un solo antimicrobiano , realizando los cálculos pertinentes para mantener la concentración adecuada de los antimicrobianos en el agar.

El rango de concentraciones usadas para realizar esta prueba con Amikacina fue: 0.25ug/ml-8.0ug/ml y para Trimetoprim-Sulfametoxazol 1:5 fue de 0.06ug/ml-8.0 ug/ml

Las suspensiones bacterianas fueron llevadas a primera transparencia tomando como referencia el Nefelómetro de Mc-Farland #0.5 que corresponde a 1.5×10^8 UFC/ml, y fueron inoculadas sobre las placas con la combinación de los antimicrobianos con ayuda del replicador de Steers.

Los resultados del efecto producido por la combinación de los antimicrobianos sobre las cepas de *Nocardia brasiliensis*, se determinaron a las 72 hrs de incubación a 37 ° C.

Para determinar si existe evidencia de inhibición sinérgica, los resultados son expresados gráficamente en un ISOBOLOGRAMA.(tanto en las ordenadas como en las abscisas las unidades de medida son ug/ml),(52). Para construir un Isobograma, la CMI para una droga es graficada en la escala horizontal y el mismo punto final para la otra droga sola es graficada en la escala vertical, usando escalas aritméticas que interceptan en el valor cero. Por cada concentración de antimicrobiano localizado en la escala horizontal, se determina una CMI del antimicrobiano en la escala vertical en el Isobograma. El sinergismo está indicado por una isobograma con una línea curvada o combada en dirección al punto de intersección de los ejes vertical y horizontal. Una línea recta representa un isobograma que indica un efecto aditivo entre los dos antimicrobianos. El antagonismo está indicado por un isobograma que se arquea hacia arriba alejándose del punto de intersección.

4. Curva de Muerte Bacteriana

Se preparó una suspensión bacteriana de diferentes cepas de la misma manera en que fue preparada para la obtención de la CMI: a partir del medio de conservación las cepas fueron resembradas a 5 ml de caldo BHI con perlas de vidrio 0.5mm de diámetro y luego de 72 hrs de incubación a 37⁰C, se sembraron en agar Sabouraud inclinado y se permitió que se desarrollaran; con asa de platino, la cepas se inocularon en caldo Mueller-Hinton con 0.02% de Tween 80 y perlas de vidrio 0.5 mm de diámetro y se incubaron por 72 hrs en agitación continua y mezclando en Vortex diariamente 2 o 3 veces por espacio de 30 minutos. Se realizó una resiembra de los sobrenadantes a un tubo con 5ml de caldo BHI fresco, Tween 80 y perlas de vidrio, incubándose igualmente y mezclando diariamente. Después de las 72 hrs de incubación el cultivo se centrifugó y los sobrenadantes se lavaron en solución salina

fisiológica estéril (SSE) por centrifugación a 900 xg, se resuspendieron con nueva SSE y se igualaron al tubo No. 1 del Nefelómetro de Mc-Farland, que corresponde a 3.0×10^8 UFC/ml.

La suspensión bacteriana de trabajo de cada cepa probada se inoculó a un matraz conteniendo 50 ml de caldo Mueller-Hinton, y 40 perlas de vidrio de diámetro 0.5 mm, en un volumen adecuado para tener una concentración final de la bacteria igual a 1×10^6 UFC/ml.

Se probaron concentraciones inhibitorias iguales a la CMI de Amikacina, Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5) y la combinación de ambos para cada cepa, al igual que concentraciones subinhibitorias de cada antimicrobiano de la siguiente manera:

Se utilizaron las cepas 13 y 38 de *Nocardia brasiliensis*, en las cuales se observó susceptibilidad con combinaciones que presentaron un efecto sinérgico en la inhibición bacteriana. Además se utilizó la cepa 91 para la cual la combinación de Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5) sólo resultó en una acción aditiva, con el fin de observar la diferencia en la cinética de la muerte bacteriana con respecto a la cinética de las cepas para las cuales esta combinación mostró sinergismo.

Para la cepa 13 se utilizaron las siguientes concentraciones:

-Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5)

4 ug/ml, CMI

2 ug/ml, concentración subinhibitoria.

-Amikacina

2 ug/ml, CMI

1 ug/ml, concentración subinhibitoria.

-Amikacina/Trimetoprim-Sulfametoxazol(1:5)

1.0 ug/ml Amikacina + 0.0625 ug/ml Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5), CMI.

0.5 ug/ml Amikacina + 0.25 ug/ml Trimetoprim-sulfametoxazol (1:5), concentración subinhibitoria.

Para la cepa 38 se utilizaron las siguientes concentraciones:

-Trimetoprim-Sulfametoxazol(1:5)

4 ug/ml, CMI.

2 ug/ml, concentración subinhibitoria

-Amikacina

2 ug/ml, CMI.

1 ug/ml, concentración subinhibitoria.

-Amikacina/Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5)

0.5 ug/ml Amikacina + 0.0625 ug/ml Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5),CMI

0.25 ug/ml Amikacina + 1.0 ug/ml Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5), concentración subinhibitoria.

Para la cepa 91 se utilizaron las siguientes concentraciones:

-Trimetoprim-Sulfametoxazol(1:5)

4 ug/ml,CMI.

2 ug/ml,concentración subinhibitoria.

-Amikacina

2 ug/ml,CMI.

1 ug/ml,concentración subinhibitoria.

-Amikacina/Trimetoprim-Sulfametoaxol(1:5)

0.5 ug/ml Amikacina + 2 ug/ml Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5),CMI.

0.25u/ml Amikacina + 1 ug/ml Trimetoprim-Sulfamtoxazol(1:5)

concentración subinhibitoria.

Antes de añadir el (los) antimicrobianos se tomó una muestra de cada matraz a la hora 0, y luego una a las 2,4,6,8,24,48 y 72 hrs, después de haber añadido el (los) antibióticos . De cada una de las muestras tomadas a las diferentes horas se realizaron diluciones seriadas decimales y se realizaron las cuentas bacterianas en cajas de Petri con agar BHI (52). Esto se hizo por triplicado utilizando el método de extensión con varilla. Los resultados se graficaron para determinar el efecto de cada uno de los antimicrobianos y su combinación sobre cada cepa probada con relación al tiempo (cinética de la curva de muerte bacteriana.).

RESULTADOS

1.-Determinación de la CMI para Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol en cepas de *Nocardia brasiliensis*.

Interpretación:

Una capa densa de crecimiento o más de una colonia, se considera evidencia del que el antimicrobiano falló para inhibir el crecimiento bacteriano a esa concentración.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la concentración más pequeña del antibiótico que fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Como puede observarse en la Tabla No. 1, 29 cepas fueron inhibidas por una CMI de amikacina igual a 2.00 ug/ml; solamente una cepa, todas las cepas fueron inhibidas por una CMI de Amikacina igual a 4.00 ug/ml y 7 de ellas, , fueron inhibidas por una CMI de Amikacina igual a 1.00ug/ml. Igualmente las 30 cepas probadas en su susceptibilidad a Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5), muestran ser inhibidas por una CMI de TMP-SMZ(1:5) igual a 4.00ug/ml, 7 cepas por una CMI de TMP-SMZ igual a 2.00ug/ml y sólo dos cepas por una CMI de TMP-SMZ igual a 1.00ug/ml.

2.- Determinación del efecto de la combinación de Amikacina y Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Interpretación:

Una capa densa de crecimiento se considera evidencia de que los antimicrobianos fallaron para inhibir el crecimiento bacteriano a esa proporción.

El efecto observado de la interacción de los antimicrobianos puede ser:

ADITIVO: Se determina acción aditiva cuando el efecto de la combinación de ambas drogas es igual a la suma de sus efectos independientes, cuando son medidos por separado.

SINERGICO: Se determina acción sinérgica cuando el efecto de la combinación de ambas drogas es significativamente mayor que la suma de sus efectos independientes, cuando son medidos por separado, o cuando la CMI de la combinación es 4 veces menor que la CMI para cada uno de los antimicrobianos cuando son probados independientemente.

ANTAGONICO: Se determina efecto antagónico cuando el efecto de la combinación de las drogas es significativamente menor que la suma de sus efectos cuando se miden separadamente.

Cuando estos antimicrobianos se combinaron *In vitro* en diferentes proporciones utilizando un rango de concentraciones igual a 0.25ug/ml-8ug/ml para Amikacina y 0.012ug/ml-8ug/ml para TMP-SMZ (1:5), 27 de las 30 cepas evaluadas muestran ser inhibidas por concentraciones muy pequeñas de los antimicrobianos, observándose un efecto sinérgico, según la definición de sinergismo arriba mencionada y sólo 3 son inhibidas por concentraciones que muestran un efecto aditivo de la combinación (Tabla No.1).

T A B L A No. 1

CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE AMIKACINA, TMP-SMZ Y LA COMBINACION DE AMBOS EN 30 CEPAS DE *Nocardia brasiliensis*.

Antimicrobiano	CMI(ug/ml)	No. de cepas susceptibles
Amikacina	4.00	30
	2.00	29
	1.00	7
TMP-SMZ	4.00	30
	2.00	7
	1.00	2
TMP-SMZ/Amikacina	1.0000/1.00	30
	0.5000/1.00	28
	0.2500/1.00	27
	0.1250/1.00	26
	0.1250/0.50	25
	0.0625/1.00	13
	0.0625/0.50	12
	0.0625/0.25	1

En la Tabla No. 2 puede observarse que el 50 % de las cepas muestra ser inhibidas por una CMI de la combinación Amikacina TMP-SMZ (1:5) igual a 0.0625ug/ml de TMP-SMZ 1:6 y 1.00ug/ml de Amikacina, un 90% por una CMI de la combinación igual a 0.125 de TMP-SMZ (1:5) y 0.05ug/ml de Amikacina, mientras que todas las cepas son inhibidas por una CMI de la combinación igual a 1.00ug/ml de TMP-SMZ (1:5) Y 1.00ug/ml de Amikacina.

Los isobogramas correspondientes al efecto producido por la combinación de estos antimicrobianos sobre cada una de las cepas probadas, se observan en las páginas 30-37 (gráficas 1 a 30) .A pesar de que los isobogramas de las cepas 20, 34 y 91 (gráficas 28,29 y 30) tienen una línea curvada hacia el punto de intersección de los ejes vertical y horizontal , lo que corresponde a un isobograma de sinergismo, se ha considerado que estas cepas fueron inhibidas por combinaciones de los antimicrobianos con un efecto aditivo, pues la CMI de cualquiera de los antimicrobianos en combinación para estas cepas probados no es 4 veces menor que la CMI de cada uno de ellos cuando fueron probados independientemente.

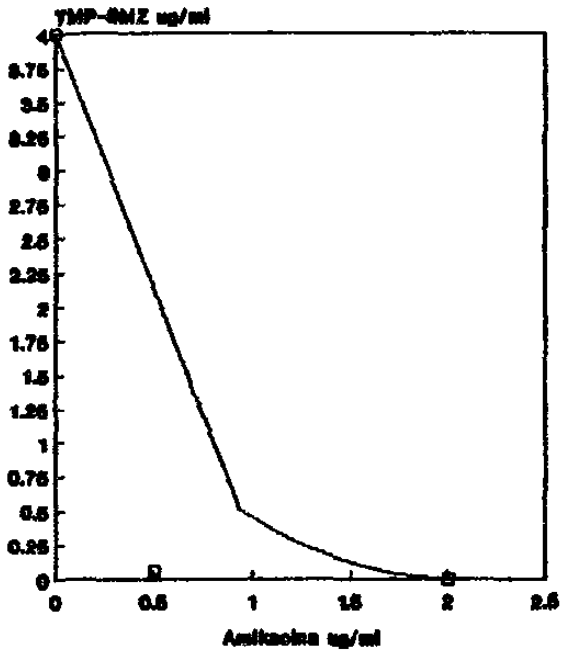
T A B L A No. 2

EFFECTO COMPARATIVO In vitro DE LA ACTIVIDAD DE AMIKACINA Y TMP-SMZ, Y LA COMBINACION DE AMBOS ANTIMICROBIANOS EN 30 CEPAS DE *Nocardia brasiliensis*.

Antimicrobiano	Por ciento de cepas inhibidas						
	Rango de conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	25%	50%	75%	90%	95%	100%
		CMI($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
Amikacina	0.25-32.0	1.00	2.00	2.00	2.000	2.0	4
TMP-SMZ	1.66-200.0	2.00	4.00	4.00	4.000	4.0	4
Amikacina/	0.25-8.0	0.50	1.00	1.00	0.500	1.0	1.0
TMP-SMZ	0.06-8.0	0.06	0.06	0.06	0.125	0.5	1.0

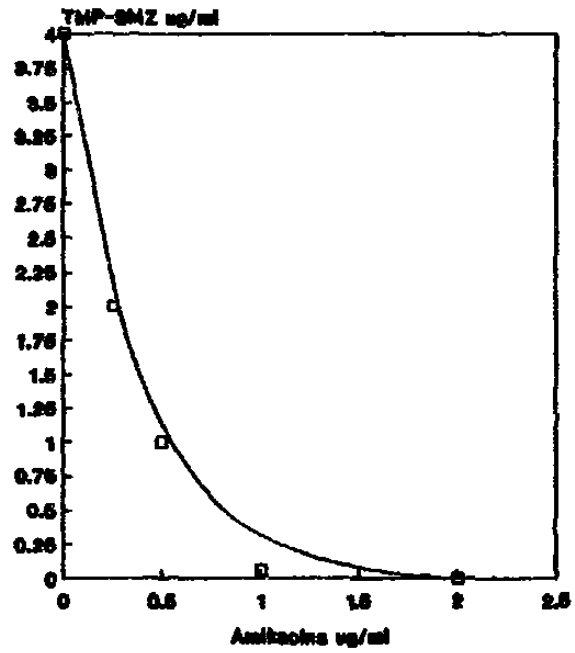
**ISOBOLOGRAMAS DE AMIKACINA-TRIMETOPRIM/
SULFAMETOXAZOL**

GRAFICA No.1
Isobograma Amikacina/TMP-SMZ



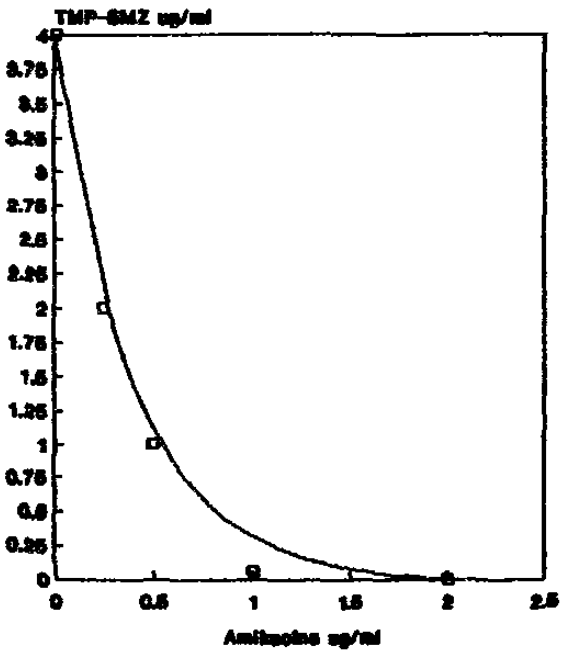
Copa No. 28

GRAFICA No.2
Isobograma Amikacina/TMP-SMZ



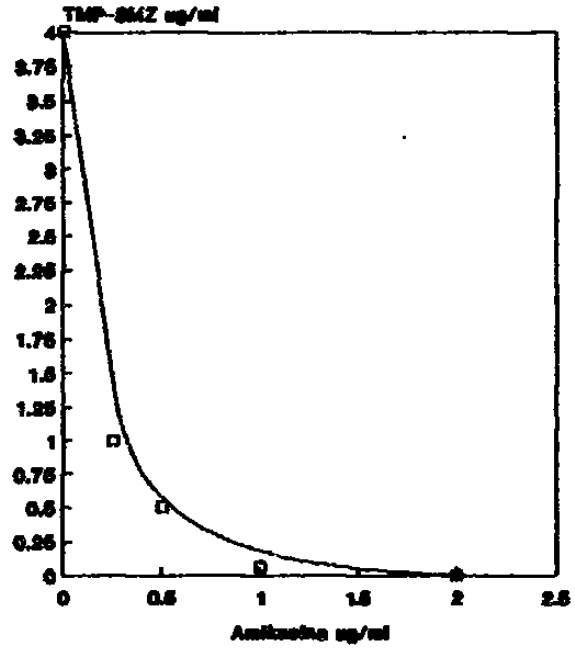
Copa No. 05

GRAFICA No.3
Isobograma Amikacina/TMP-SMZ



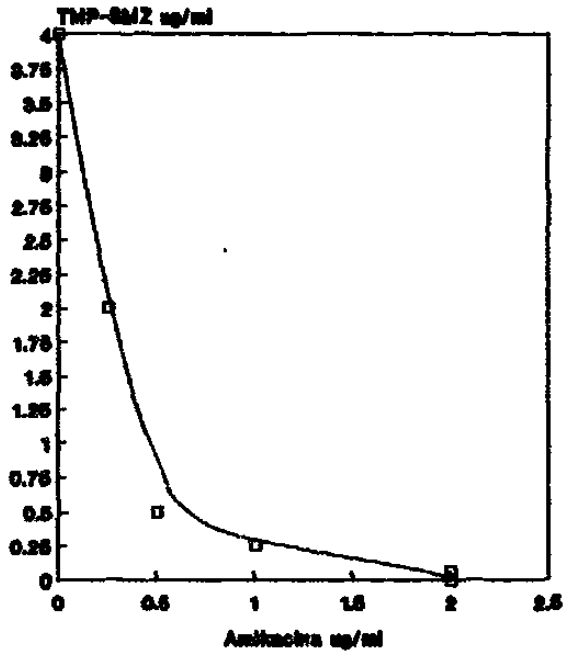
Copa No. 25

GRAFICA No. 4
Isobograma Amikacina/TMP-SMZ



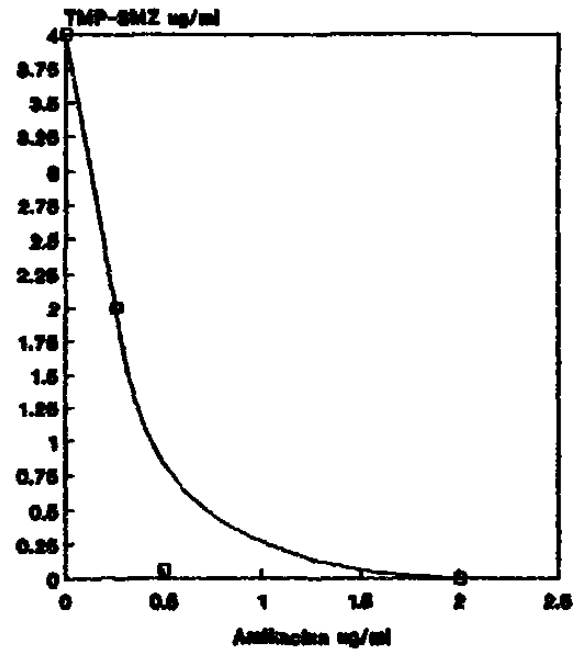
Copa No. 33

GRAFICA No. 5
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



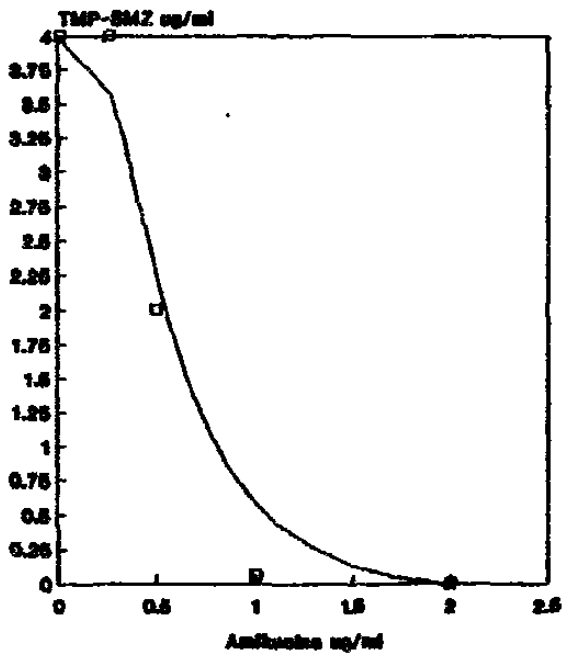
Copa No.7

GRAFICA No.6
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



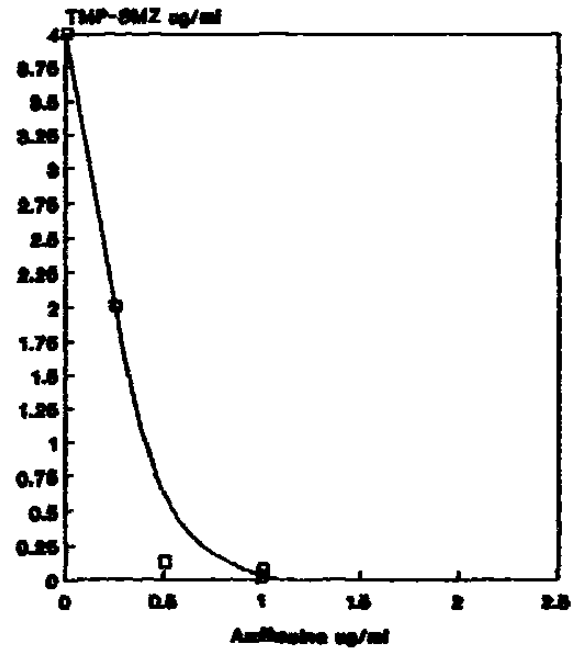
Copa No.22

GRAFICA No. 7
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



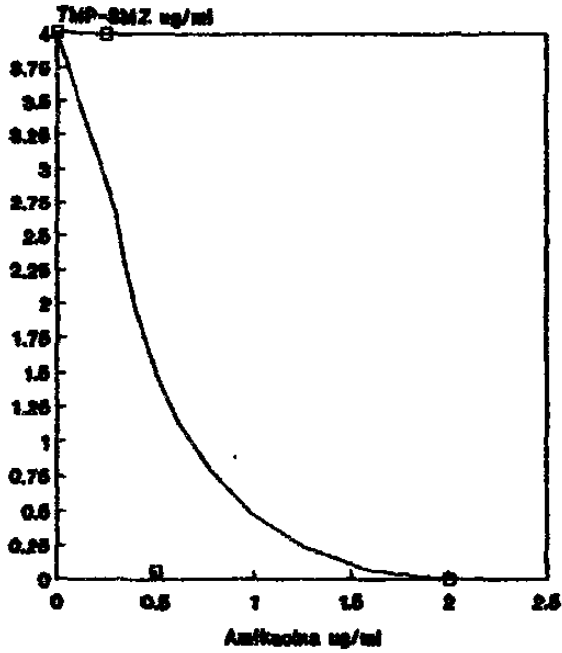
Copa No.5

GRAFICA No. 8
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



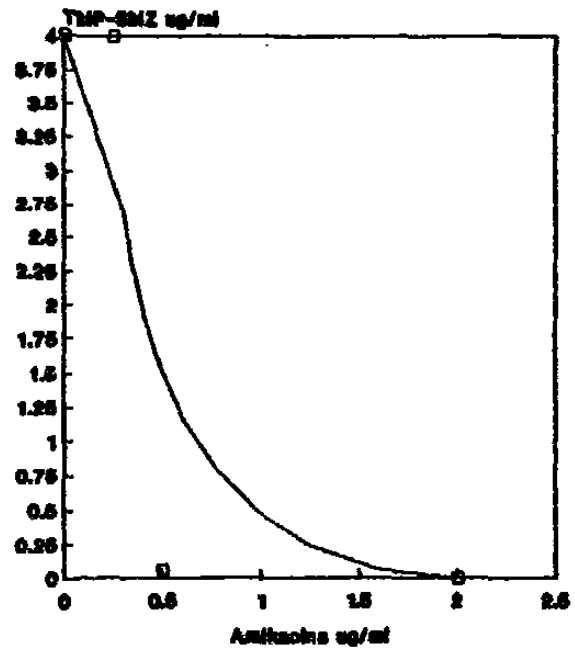
Copa No.23

GRAFICA No.9
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



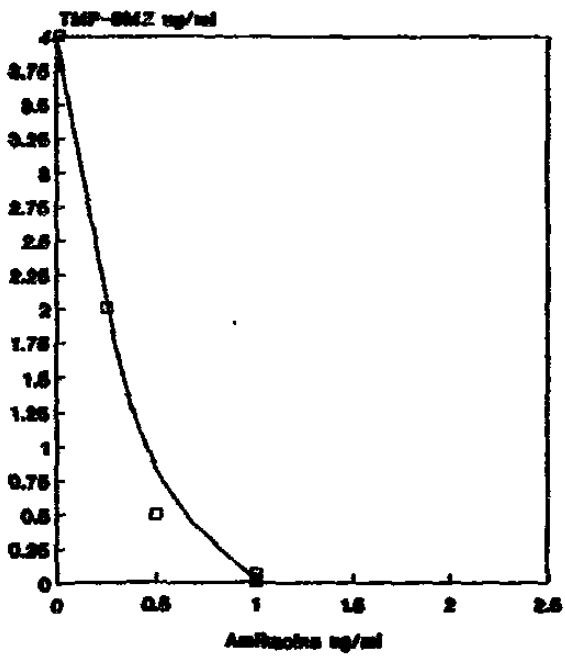
Copa No.58

GRAFICA No.10
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



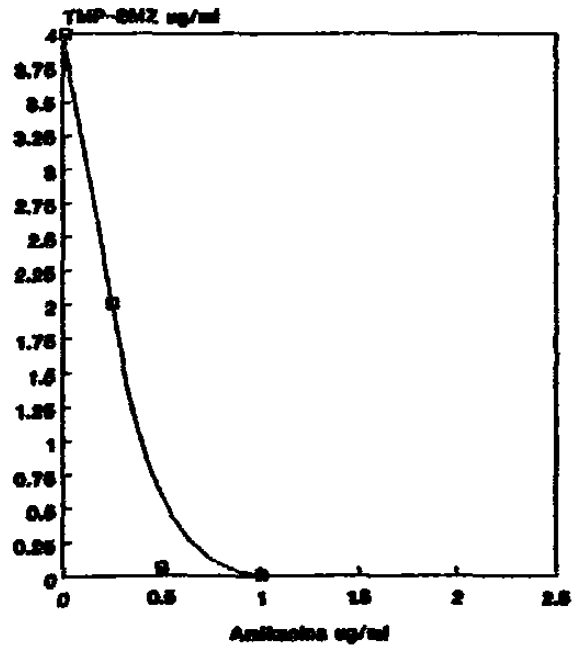
Copa No.60

GRAFICA No.11
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



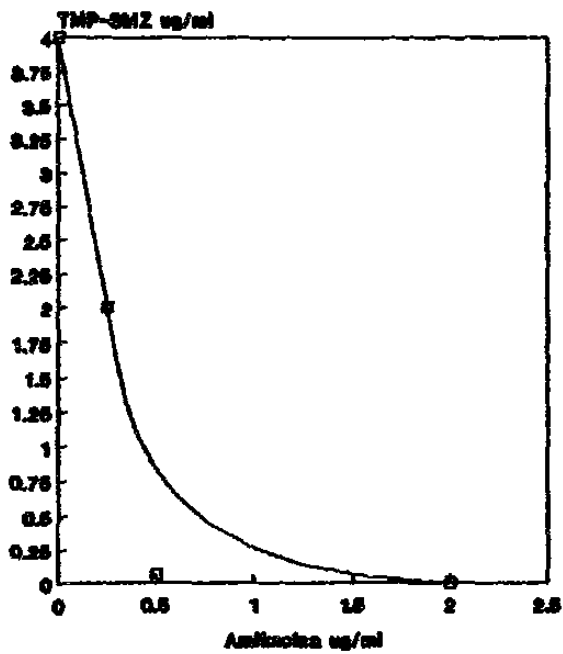
Copa No.58

GRAFICA No.12
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



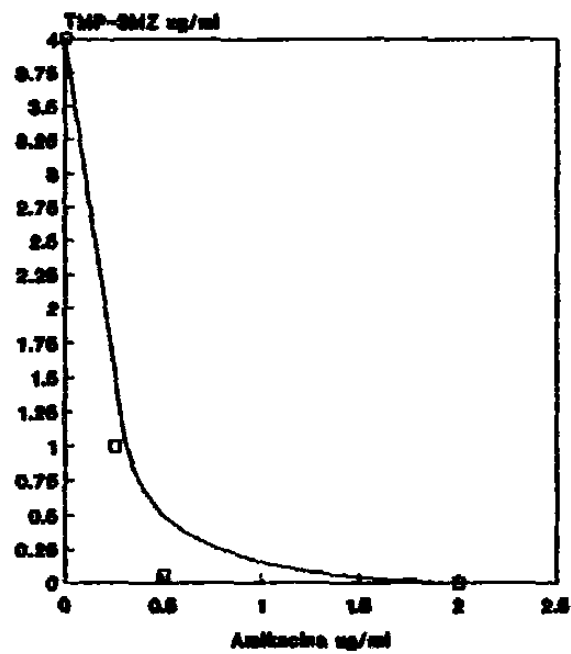
Copa No.58

GRAFICA No. 13
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



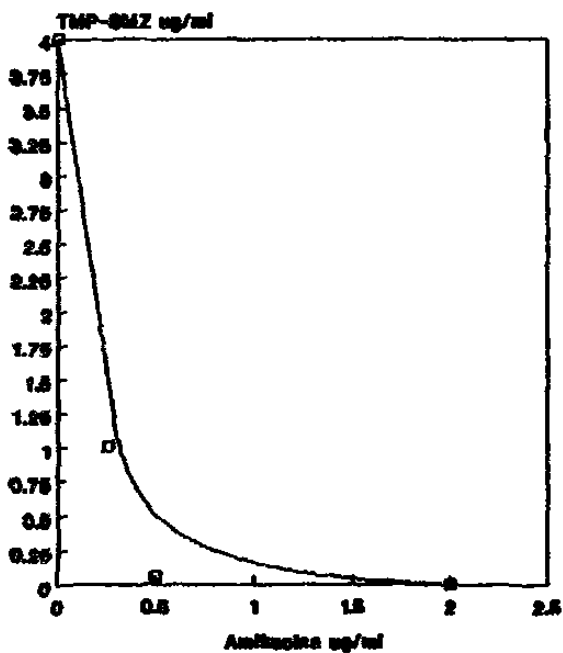
Copa No.27

GRAFICA No. 14
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



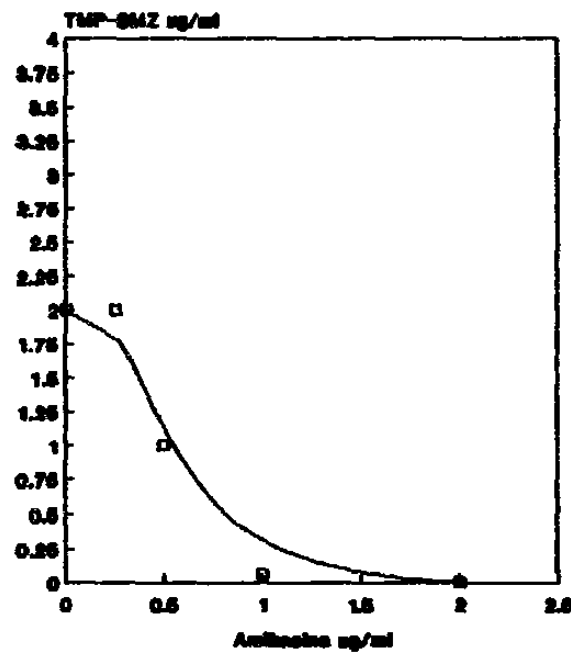
Copa No.21

GRAFICA No. 15
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ.



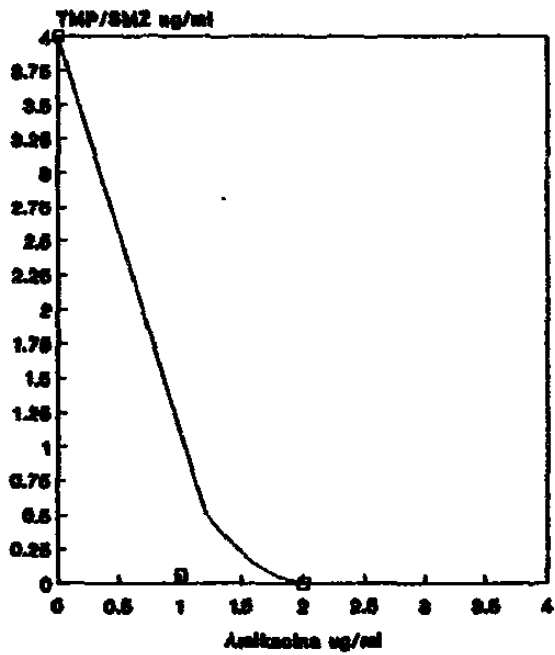
Copa No.21

GRAFICA No. 16
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



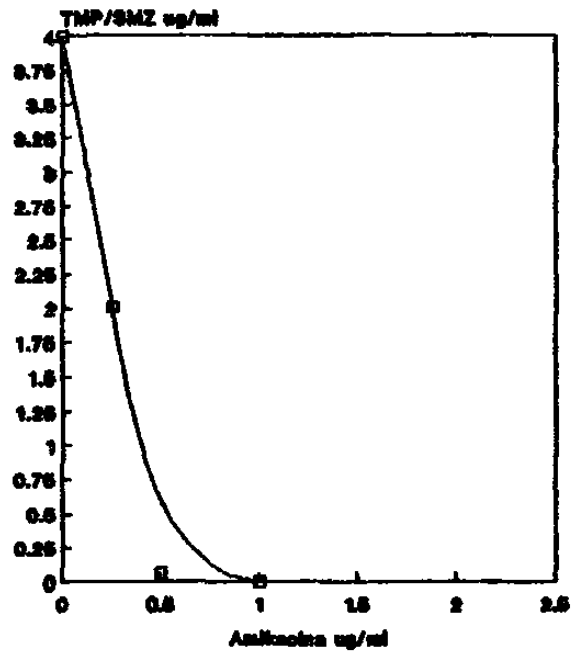
Copa No.24

GRAFICA No. 17
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



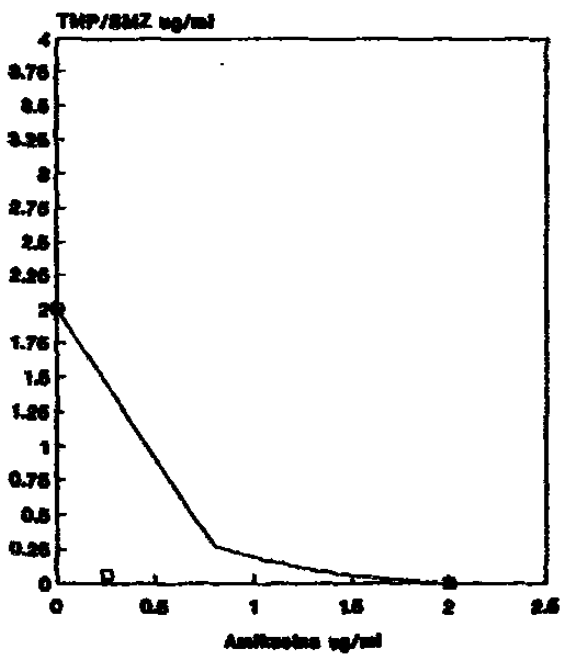
Copa No.01

GRAFICA No. 18
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



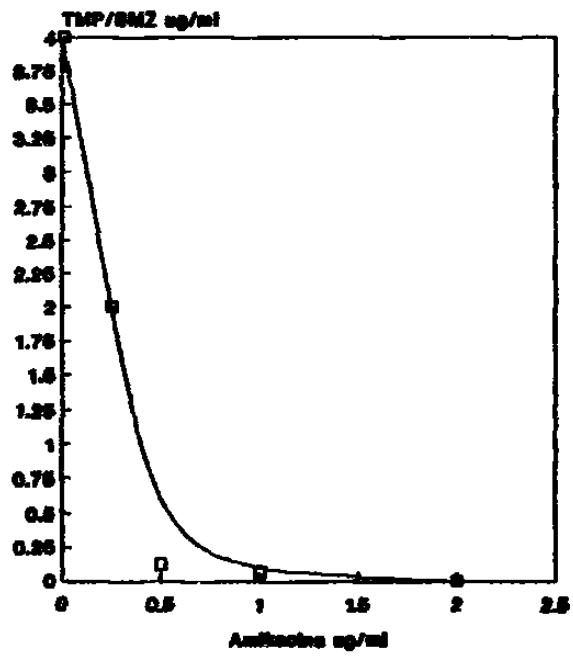
Copa No.01

GRAFICA No. 19
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



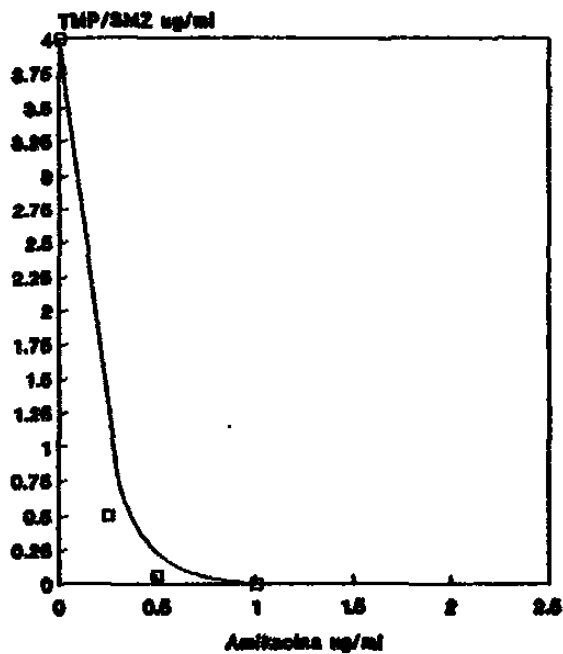
Copa No.02

GRAFICA No. 20
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



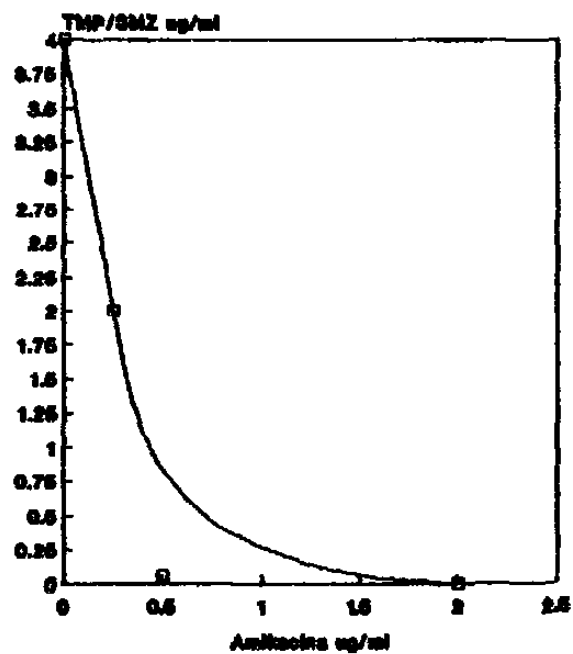
Copa No.02

GRAFICA No. 21
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



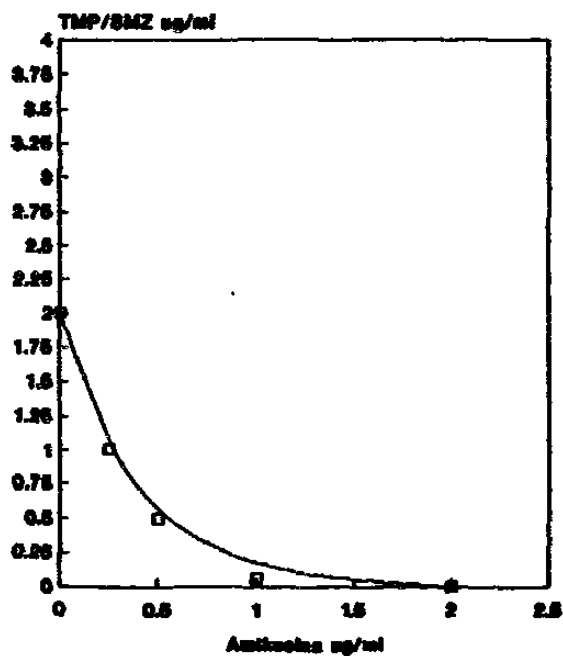
Copa No.47

GRAFICA No. 22
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



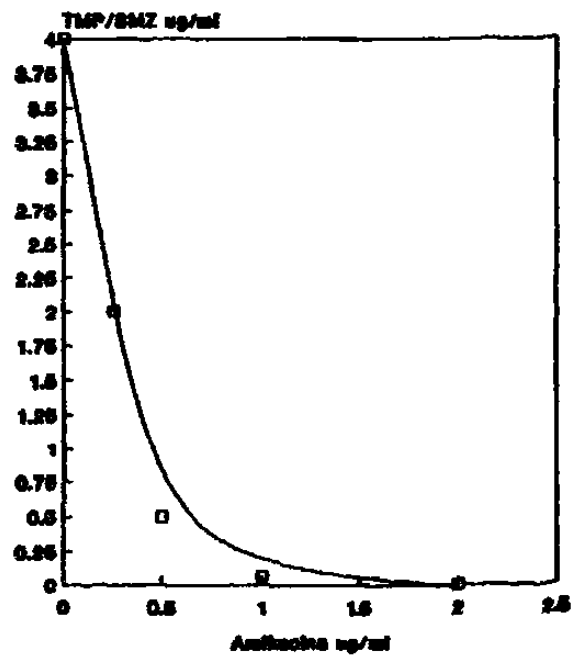
Copa No. 89

GRAFICA No. 23
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



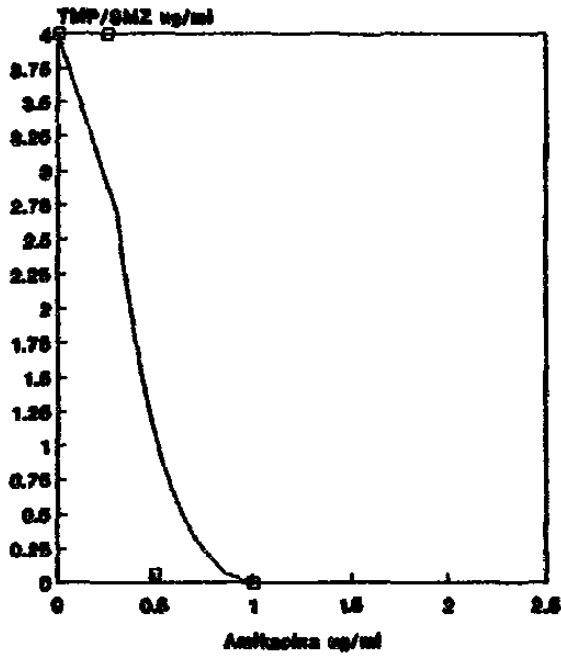
Copa No.1

GRAFICA No. 24
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



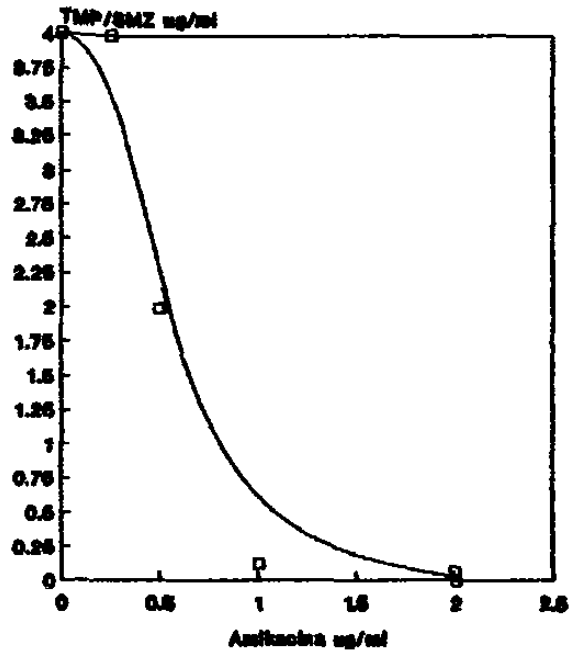
Copa No.15

GRAFICA No. 26
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



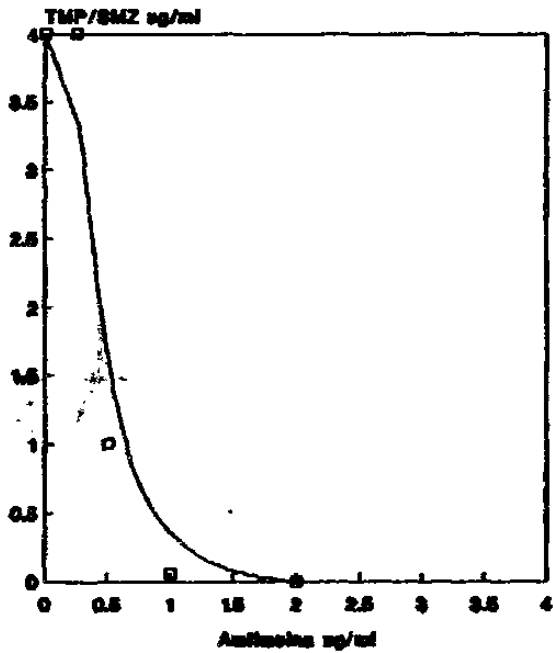
Copa No.5

GRAFICA No. 26
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



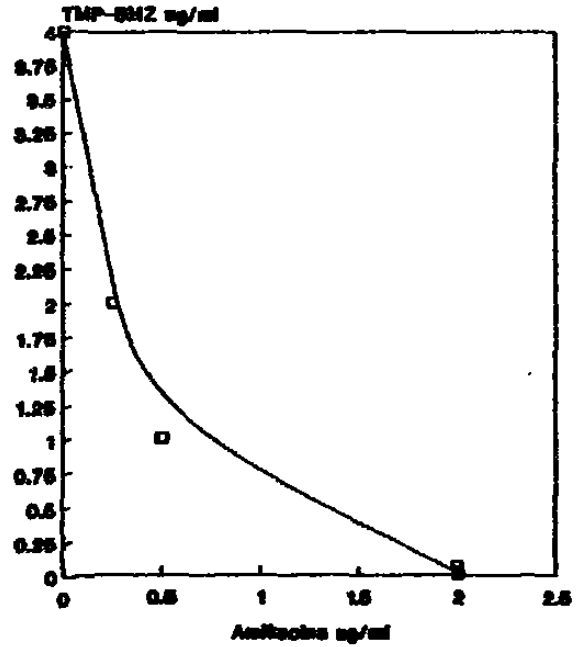
Copa No.48

GRAFICA No. 27
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



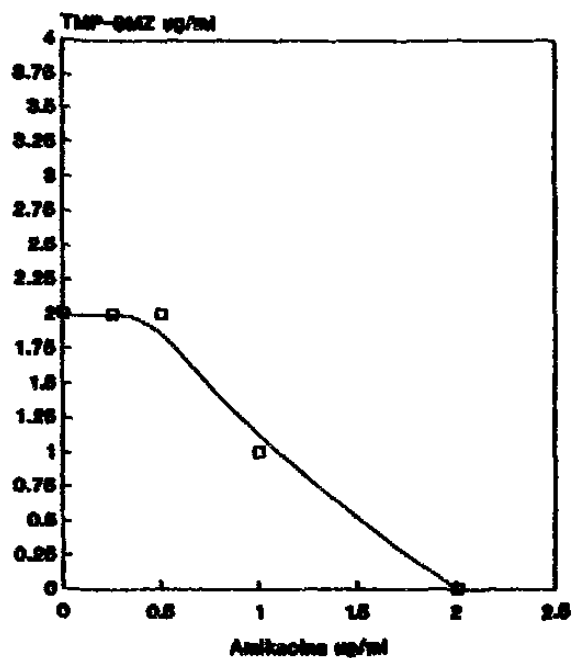
Copa No.22

GRAFICA No. 28
Isoblograma Amikacina/TMP-SMZ



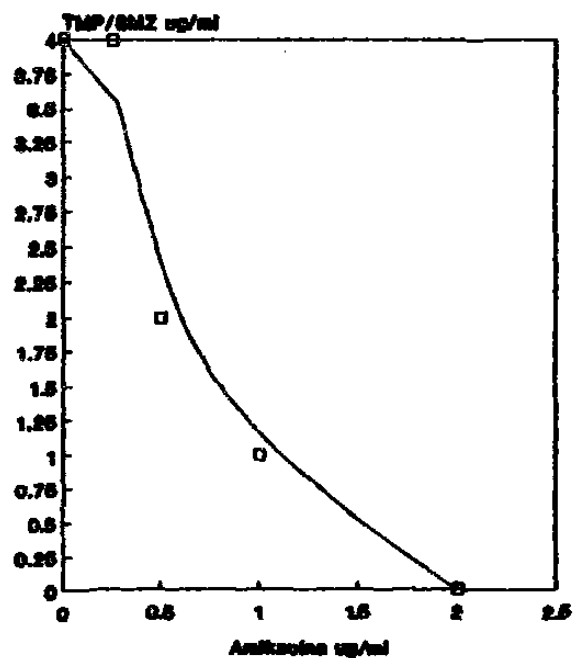
Copa No.28

GRAFICA No. 29
Isobograma Amikacina/TMP-SMZ



Copa No.24

GRAFICA No. 30
Isobograma Amikacina/TMP-SMZ



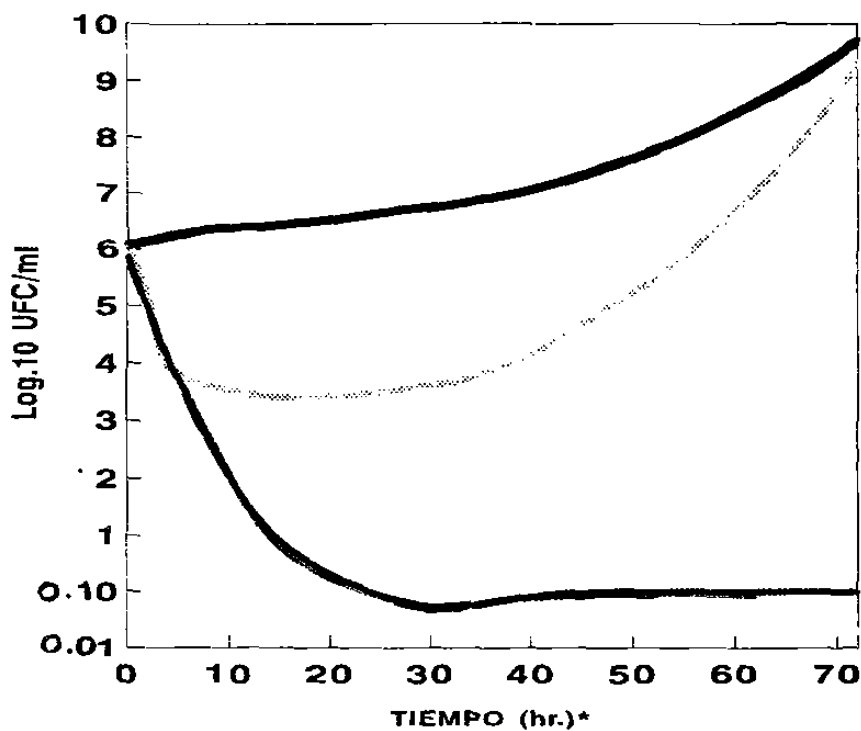
Copa No.31

3.- Curva de Muerte bacteriana

Los ensayos de muerte bacteriana utilizando concentraciones inhibitorias y subinhibitorias de Amikacina y TMP-SMZ(1:5) rindieron las siguientes gráficas, donde se observa que al utilizar la CMI de Amikacina para la cepa 13 de *Nocardia brasiliensis* igual a 2.0ug/ml , la viabilidad llega a cero a las 48 hrs. después de añadido el antimicrobiano, mientras que para TMP-SMZ 1:5 ocurre esto a las 24 hrs. utilizando una CMI de 4.0ug/ml; cuando se utilizan concentraciones subinhibitorias de los mismos es de esperarse que la viabilidad no se inhibió completamente en el tiempo en que se realizó la determinación (gráficas 31 y 32).

GRAFICA No. 31

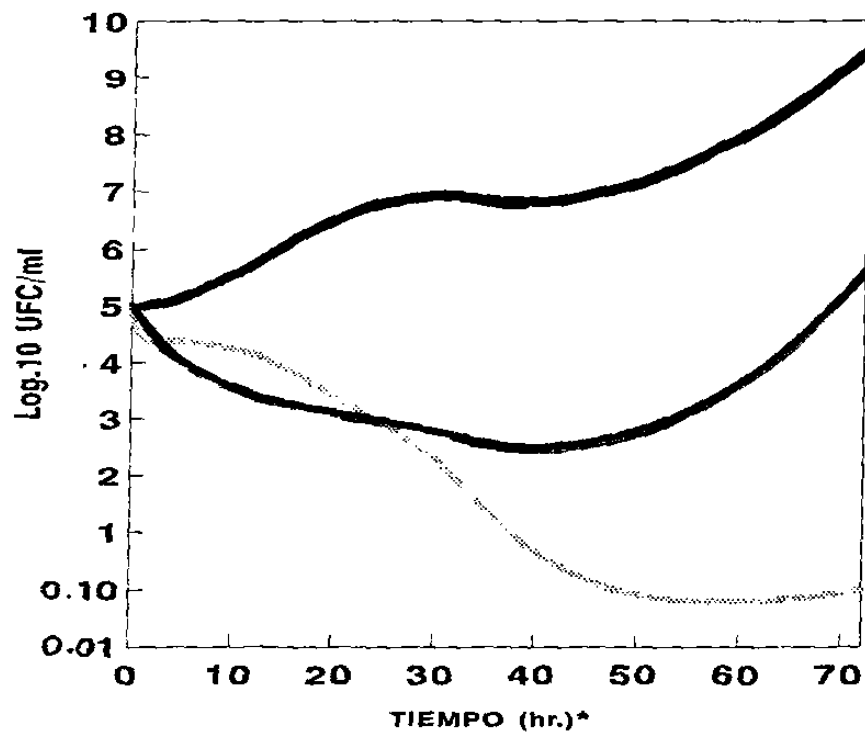
Curva de muerte, TMP/SMZ CEPA 13



—●— TMP/SMZ 4ug/ml —●— TMP/SMZ 2UG/ml —●— Control

* Tiempo en horas después de haber añadido el antimicrobiano.

GRAFICA No. 32

**Curva de muerte, Amikacina
CEPA 13**

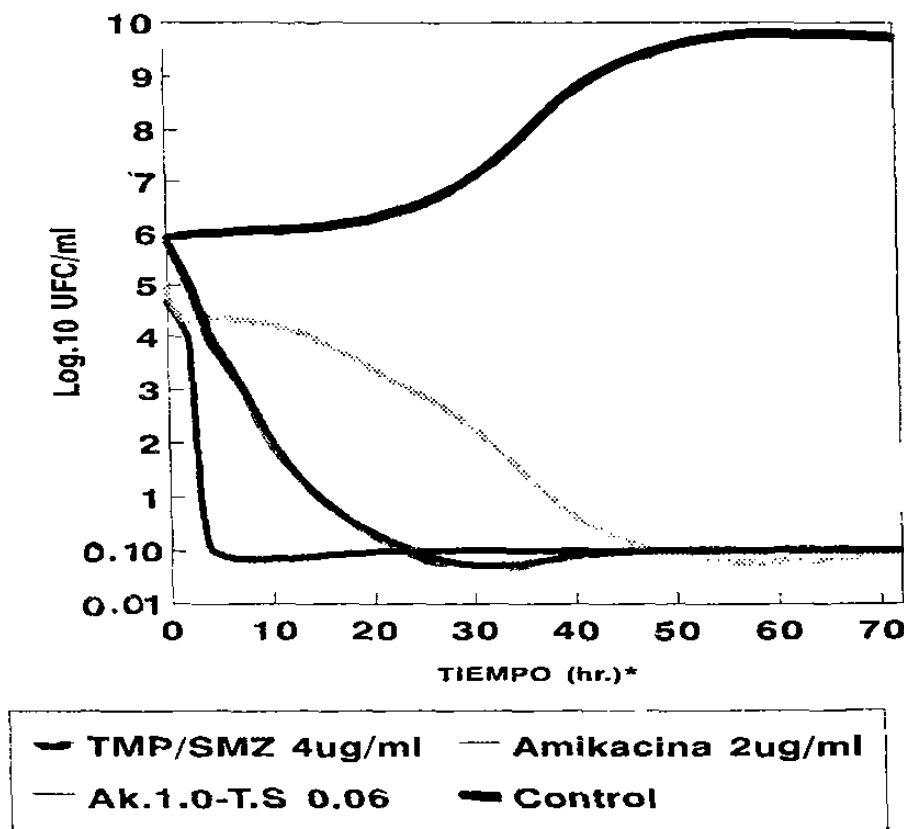
— Amikacina 1ug/ml — Amikacina 2ug/ml — Control

*Tiempo en horas después de añadido el antimicrobiano.

Cuando estos antimicrobianos fueron probados en combinación en las mismas concentraciones (Amikacina 2ug/ml+Trimetoprim-Sulfametoxazol 1:5 4ug/ml) sobre la cepa 13, se observa claramente que su viabilidad llega a cero tan sólo a las 4 hrs. después de añadida la combinación (gráfica 33). Este efecto puede observarse mejor en la gráfica donde se han graficado únicamente los resultados de las primeras 5 hrs después de añadidos los antimicrobianos en combinación (gráfica 34).

GRAFICA No. 33

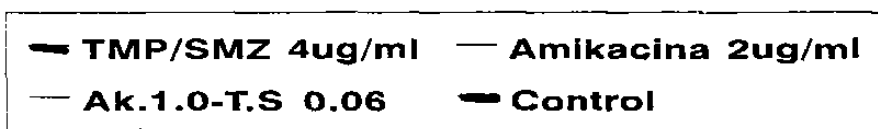
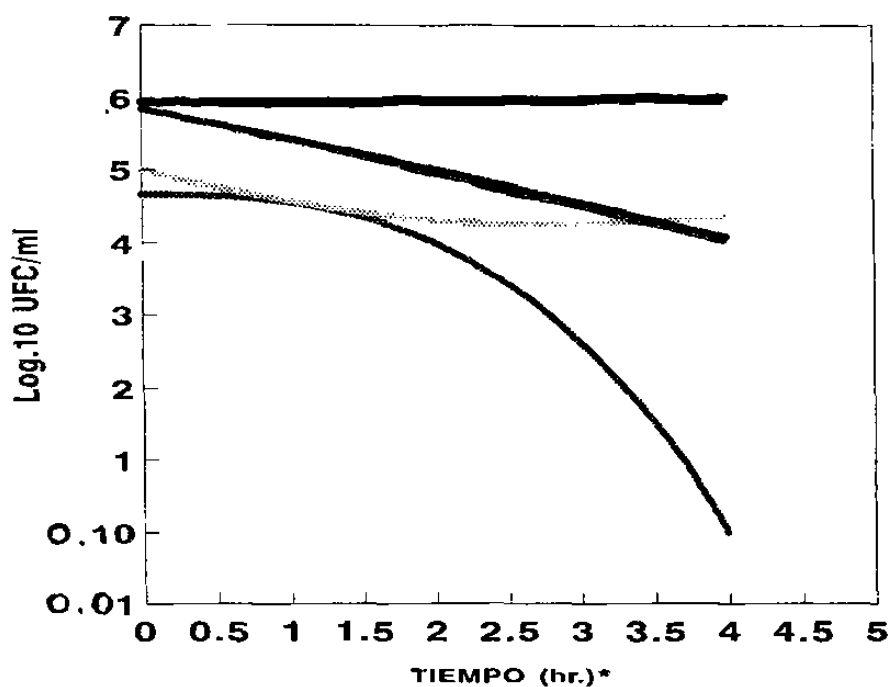
**Curva de Muerte, Amikacina/TMP-SMZ
CEPA 13**



*Tiempo en horas después de haber añadido el (los) antimicrobiano (s).

GRAFICA No.34

**Curva de muerte,Amikacina/TMP-SMZ
CEPA 13**



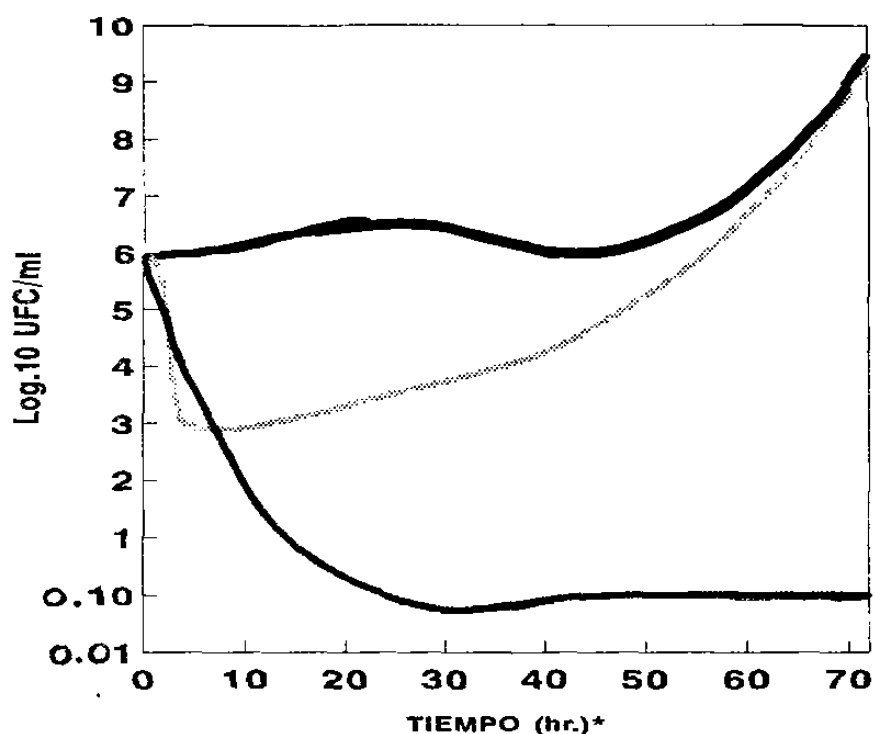
*Tiempo en horas después de haber añadido el (los) antimicrobiano (s).

** Ak 1.0-T.S 0.06= Amikacina 1µg/ml- TMP-SMZ 0.06µg/ml

Igualmente se observa este efecto cuando se combinan concentraciones inhibitorias de ambos antimicrobianos sobre la cepa 38 de *Nocardia brasiliensis*, (gráfica 37). El efecto de los antimicrobianos probados independientemente sobre esta cepa puede observarse en las gráficas No. 35 y No. 36.

GRAFICA No. 35

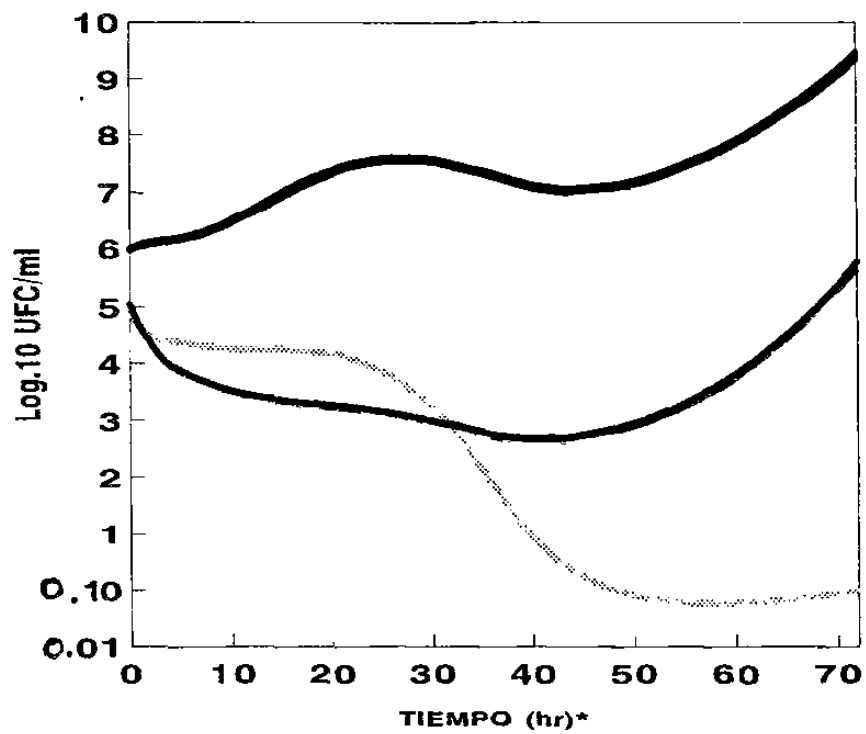
**Curva de muerte, TMP/SMZ
CEPA 38**



— TMP/SMZ 4ug/ml — TMP/SMZ 2UG/ml — Control

*Tiempo en horas después de haber añadido el antimicrobiano.

GRAFICA No. 36

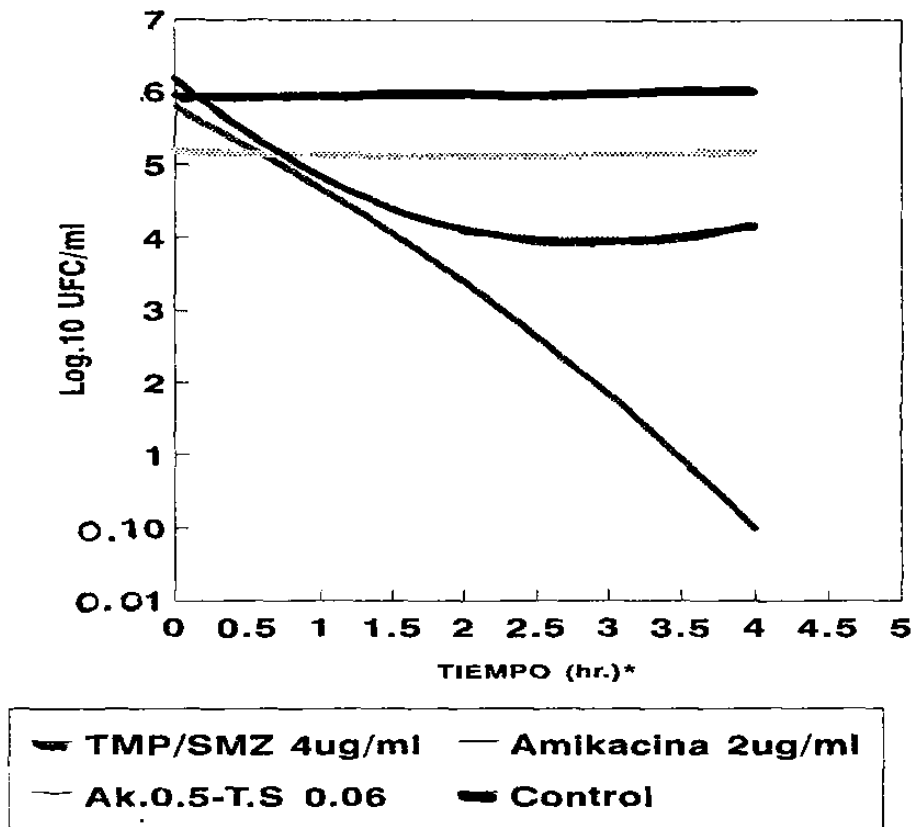
**Curva de muerte, Amikacina
CEPA 38**

— Amikacina 1ug/ml - - - Amikacina 2ug/ml — Control

*Tiempo en horas después de haber añadido el antimicrobiano.

GRAFICA No. 37

**Curva de Muerte, Amikacina/TMP-SMZ
CEPA 38**



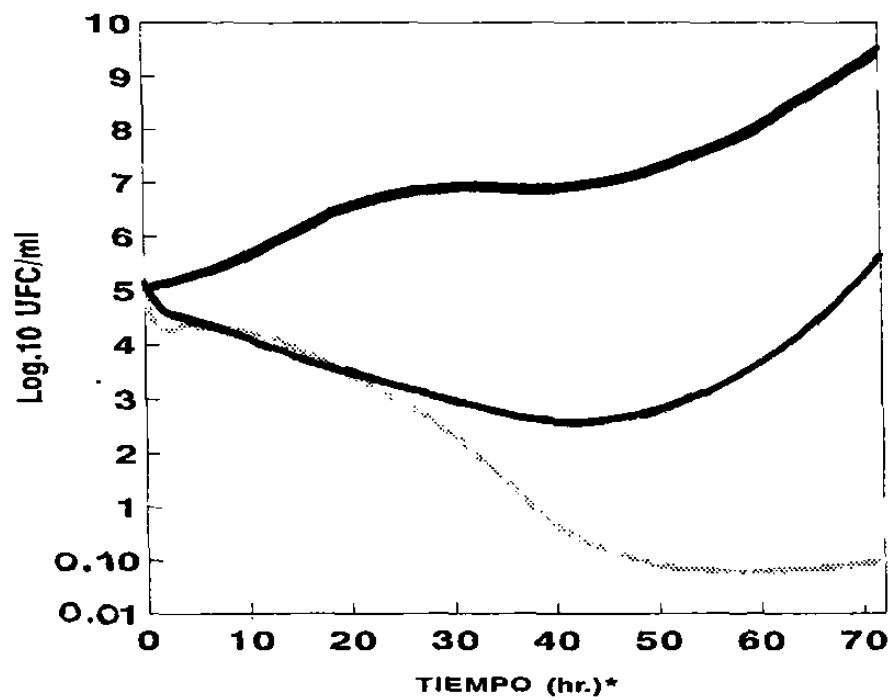
*Tiempo en horas después de haber añadido el (los) antimicrobiano (s).

** Ak 1,0-T.S 0.06= Amikacina 1µg/ml- TMP-SMZ 0.06µg/ml

La cepa 91 de *Nocardia brasiliensis* para la cual la combinación de Amikacina y Trimetoprim 1:5 resultó en un efecto aditivo en la inhibición del crecimiento, fue igualmente inhibida a las cuatro horas después de añadidas concentraciones inhibitorias de la combinación de estos antimicrobianos (gráfica 40 y 41), mientras que 2ug/ml de Amikacina (CMI para esa cepa), probada independientemente, inhibió su crecimiento a las 48hrs (gráfica 38). Igualmente una concentración inhibitoria (CMI) de Trimetoprim-Sulfametoxazol igual a 4ug/ml inhibió esta cepa a las 24 hrs, cuando se probó independientemente (gráfica 39). Concentraciones subinhibitorias de estos antimicrobianos no inhibieron completamente el crecimiento de esta cepa (gráficas 38 y 39).

GRAFICA No.38

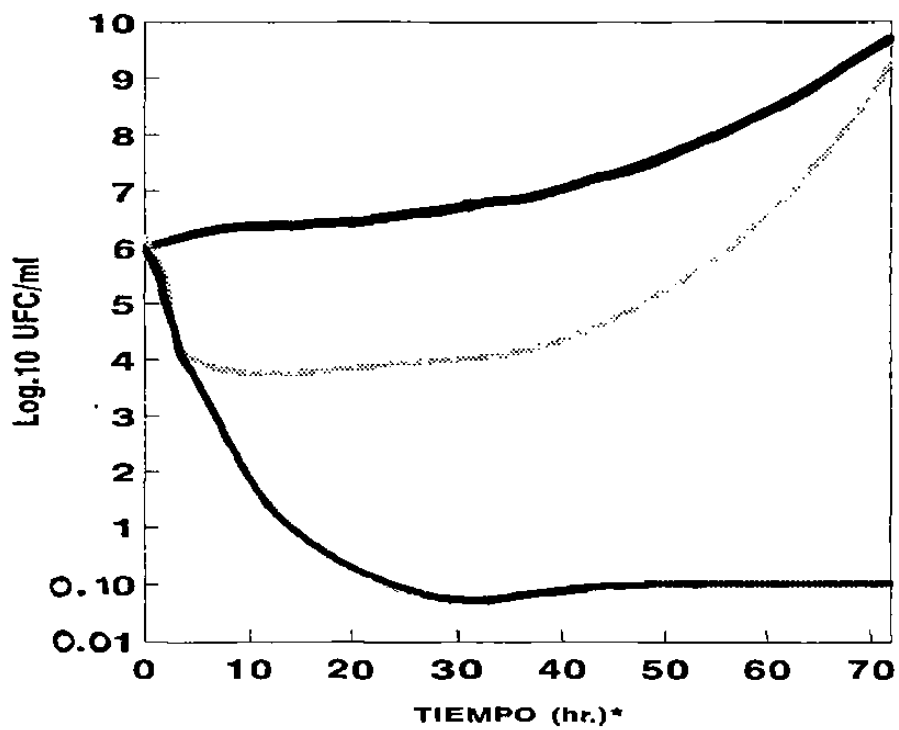
Curva de muerte, Amikacina CEPA 91



— Amikacina 1ug/ml — Amikacina 2ug/ml — Control

*Tiempo en horas después de haber añadido los antimicrobianos.

GRÁFICA No. 39

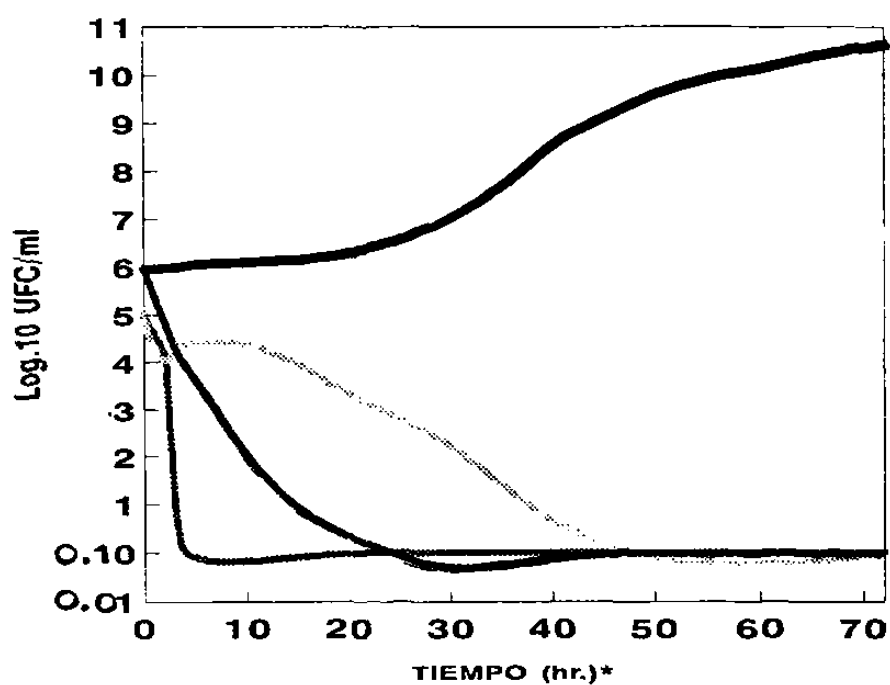
**Curva de muerte, TMP/SMZ
CEPA 91**

— TMP/SMZ 4ug/ml — TMP/SMZ 2UG/ml — Control

*Tiempo en horas después de haber añadido el antimicrobiano.

GRÁFICA No. 40

**Curva de muerte, Amikacina/TMP-SMZ
CEPA 91**



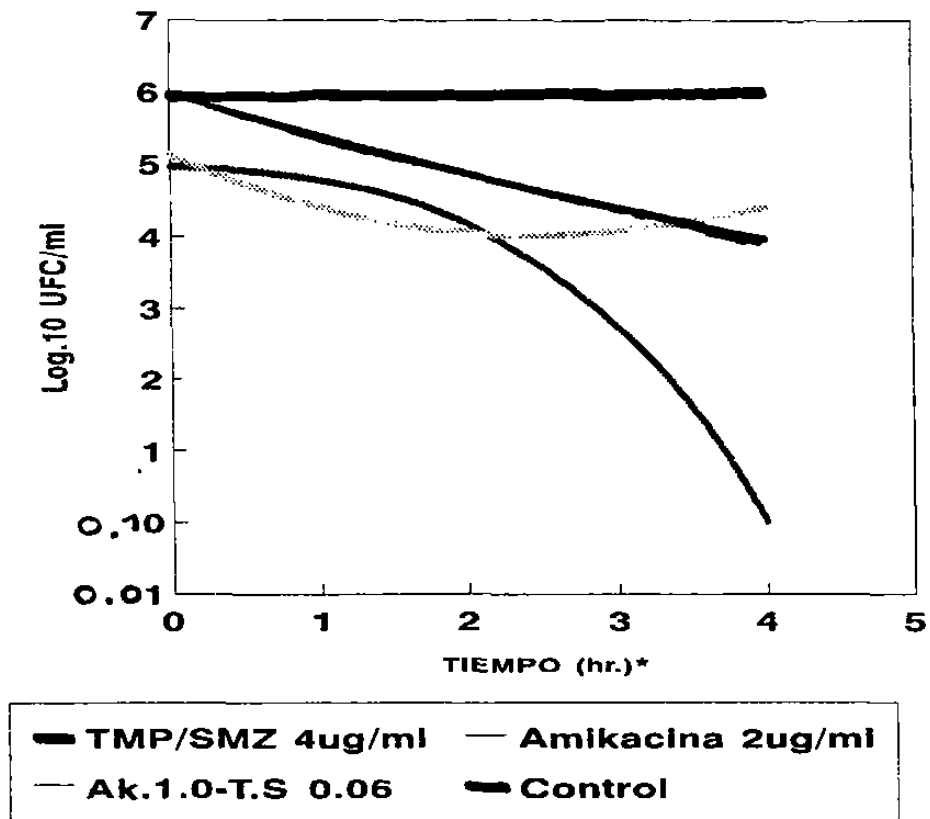
— TMP/SMZ 4ug/ml	— Amikacina 2ug/ml
— Ak.0.5-T.S 2.0	— Control

*Tiempo en horas después de haber añadido el (los) antimicrobiano (s).

** Ak 1.0-T.S 0.06= Amikacina 1µg/ml- TMP-SMZ 0.06µg/ml

GRÁFICA No. 41

**Curva de muerte, Amikacina-TMP/SMZ
CEPA 91**



*Tiempo en horas después de haber añadido el (los) antimicrobiano (s).

** Ak 1.0-T.S 0.06= Amikacina 1µg/ml- TMP-SMZ 0.06µg/ml

1020091285

DISCUSION

Los síndromes clínicos asociados a la infección con bacterias del género *Nocardia* son variados y de muy diversas manifestaciones, que van desde la presentación de un minimicetoma a un micetoma con diseminación cerebral y artritis séptica por *Nocardia brasiliensis* (68,69) o de una nocardiosis pulmonar en pacientes inmunodeprimidos, hasta una pericarditis y abscesos cerebrales por *Nocardia asteroides* (54-58,67) e incluso, de acuerdo a la literatura, esta especie causa encefalitis con características parkinsonianas (66).

La susceptibilidad de las especies de *Nocardia* a diferentes fármacos es muy variable, esto en parte es debido a la presencia de una enzima de inactivación específica de especie para los aminoglicósidos, identificado como una aminoglucósido fosfotransferasa (APDH 3') en *Nocardia brasiliensis*. En contraste Amikacina y Minocyclina son activas contra todas las *Nocardias* patógenas (38).

En el presente trabajo pudo constatar que las treinta cepas de *Nocardia brasiliensis* evaluadas presentaron un patrón homogéneo de susceptibilidad para el antimicrobiano Amikacina y para TMP-SMZ (1:5).

Han sido varios los antimicrobianos reportados exitosos como quimioterápicos, especialmente para el tratamiento de pacientes con infecciones respiratorias causadas por *Nocardia asteroides* (23,32,54-56,60), pero se ha mencionado muy poco sobre pruebas de susceptibilidad de *Nocardia brasiliensis*, principal causante de micetomas en México, hacia nuevos fármacos

En nuestro estudio se confirma la hipótesis de que la combinación de los antimicrobianos Amikacina y TMP-SMZ (1:5) ejerce una acción inhibitoria sinérgica contra *Nocardia brasiliensis*, coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente por Gombert y cols. en un estudio de sensibilidad a diversos antimicrobianos realizado sobre *Nocardia asteroides* (29) en donde la actividad *In vitro* de amikacina fue probada con TMP-SMZ, mostrandose que el 83% de las cepas probadas fueron susceptibles a la acción inhibitoria sinérgica de la combinación. En el presente trabajo se demuestra vez esta misma acción sobre diversas cepas de *Nocardia brasiliensis* obtenida de pacientes con diagnóstico de micetoma actinomicótico; lo que además de corroborar nuestra hipótesis, explica los resultados obtenidos por Welsh al emplear estos antimicrobianos en el tratamiento de micetomas actinomicóticos.

Los estudios de susceptibilidad de las diferentes especies de *Nocardia* realizada por Wallace Jr y cols (34), muestran que de las tres especies patógenas de *Nocardia*, sólo *Nocardia asteroides* parece tener un patrón variable de susceptibilidad a los fármacos. Está claro en los resultados presentados aquí que no existen grandes variaciones entre las cepas de *Nocardia brasiliensis*, en su susceptibilidad a estos antimicrobianos solos y en combinación.

El efecto sinérgico de la combinación de estos antimicrobianos se observa tempranamente con respecto al tiempo, una vez que los antimicrobianos entran en contacto con *Nocardia brasiliensis* a diferencia del tiempo en que se observa el efecto ejercido por estos mismos antimicrobianos cuando son probados por separado. Este resultado es independiente del efecto ejercido por la combinación :aditivo, o sinérgico.

Hasta donde hemos investigado, nadie, además de Welsh y cols. ha utilizado la combinación de amikacina y TMP-SMZ en pacientes que sufren de micetoma actinomicético u otras infecciones nocardiosicas; nuestros hallazgos, donde se demuestra sinergismo en 27 de las treinta cepas evaluadas, explica porque el efecto terapéutico al emplear estos antimicrobianos en pacientes con micetoma actinomicético es superior en efectividad y menor en tiempo de tratamiento, que los tratamientos tradicionales.

Debido a que las infecciones con Nocardia, especialmente con *Nocardia asteroides*, son similares a las infecciones con *Mycobacterium tuberculosis* (38), esta combinación puede servir como una alternativa clínica para los pacientes que sufren infecciones con esta especie y no responden a la terapia convencional.

Diferentes reportes recientes de susceptibilidad del género Nocardia a nuevos agentes antimicrobianos solos y en combinación (52,59). han sido necesarios como resultado de la falla en el tratamiento convencional con sulfonamidas en algunos pacientes y la intolerancia a esta terapia en otros (16,18).

A pesar del tratamiento exitoso en algunos pacientes, las sulfas no son inhibitorias para algunas cepas de *Nocardia asteroides*. Esta ausencia de actividad inhibitoria puede en parte, explicar la alta tasa de mortalidad de los pacientes inmunológicamente incompetentes en cierto tipo de Nocardiosis. En modelos experimentales hay otros tratamientos basados en estudios de susceptibilidad, los cuales prueban ser superiores a las sulfas (30). Estos son específicamente Amikacina e Imipenem.

Diferentes reportes, muestran una carencia de correlación entre la susceptibilidad *In vitro* y la eficacia clínica *In vivo* (14,15), En estas infecciones, sin embargo algunos datos recientes muestran que hay muchos agentes antimicrobianos con una actividad demostrable *In vitro* que han probado ser eficaces cuando se administran como terapia a diferentes pacientes (54-58,67). En el presente trabajo hemos demostrado la importancia de la realización de las pruebas de susceptibilidad para comprobar la correlación del efecto observado *In vitro* y su eficacia *In vivo*.

Las diferentes pruebas de susceptibilidad realizadas por diversos investigadores ayudan al clínico para escoger el tratamiento más apropiado para cada paciente de manera individual, o bien ayudan a explicar los resultados obtenidos con el uso de un fármaco en especial como tratamiento. Estos datos pueden ayudar también en determinar qué antibióticos son prometedores para ensayar un modelo experimental de diferentes infecciones nocardiosicas.

En nuestro trabajo se ilustran tres puntos:

- a) El efecto sinérgico de Amikacina/TMP-SMZ como agentes antimicrobianos contra *Nocardia brasiliensis*.
- b) La importancia de la realización de las pruebas *In vitro* de susceptibilidad para explicar el éxito en la terapéutica médica.
- c) Las bases para justificar la utilización de esta combinación terapéutica en pacientes con micetoma actinomicótico que no respondan al tratamiento convencional y al mismo tiempo para probarla en otras infecciones Nocardiosicas, como infecciones pulmonares y abscesos cerebrales.

En resumen, nuestro trabajo, corrobora que el uso de Amikacina y TMP-SMZ en combinación para el tratamiento de micetomas actinomicóticos está fundamentado en un mayor efecto inhibitorio para *Nocardia brasiliensis* y posiblemente para algunas otras infecciones nocardiosicas. Además la presente metodología es de mucha utilidad para evaluar nuevos antimicrobianos y sus combinaciones para encontrar nuevas alternativas para el clínico cuando los esquemas de tratamiento y dosificación tienen poca efectividad en la cura de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Las treinta cepas de *Nocardia brasiliensis* evaluadas probaron ser homogéneamente susceptibles a la acción antimicrobiana de Amikacina y de Trimetoprim-Sulfametoxazol (1:5), observándose que el 73.33 % , fueron inhibidas por una CMI igual a 2ug/ml de amikacina y el 76.66% de ellas fueron inhibidas por una CMI de TMP-SMZ (1:5) igual a 4ug/ml.

Cuando se combinan *In vitro* Amikacina y TMP-SMZ (1:5) sus respectivas actividades se superpotencian presentando un efecto sinérgico sobre los cultivos de *Nocardia brasiliensis* como puede observarse en veintisiete de las treinta cepas evaluadas, y sólo en tres de ellas, se observó un efecto aditivo.

De los resultados observados, podemos inferir que la actividad antimicrobiana de la Amikacina es la que predomina en la acción de superpotenciación sobre la actividad de TMP-SMZ observándose esto claramente en la disminución de la CMI de la sulfonamida hasta de 66 veces para el 75 % de las cepas probadas , es decir de 4ug/ml de TMP-SMZ 1:5 (cuando se probó por separado en una suspensión de *Nocardia brasiliensis*), hasta 0.0625 ug/ml de TMP-SMZ 1:5, cuando se combinó en distintas concentraciones con la Amikacina; mientras que ésta última sólo disminuyó su CMI 4 veces al ser combinada con TMP-SMZ 1:6; es decir, de 2ug/ml a 0.5ug/ml.

Los ensayos de muerte bacteriana, en los que se utilizaron concentraciones inhibitorias y subinhibitorias de los antimicrobianos, mostraron que cuando se usan concentraciones subinhibitorias de estos el número de bacterias viables disminuye en función del tiempo sin llegar a cero; sin embargo cuando se utilizan concentraciones inhibitorias de ambos, la viabilidad bacteriana llega a cero a las 48 y 24 hrs para Amikacina y TMP-SMZ respectivamente.

Cuando los antimicrobianos fueron probados juntos en un cultivo de *Nocardia brasiliensis*, utilizando la CMI de la combinación para una cepa dada, no se observó desarrollo más allá de las 4 hrs. después de añadido el antibiótico, lo que nos indica claramente que la actividad bactericida de la combinación de Amikacina y TMP-SMZ (1:5), aparece más rápidamente que cuando estos antimicrobianos son probados por separado en una curva de muerte bacteriana de una suspensión de *Nocardia brasiliensis*. Estos resultados son independientes al efecto ejercido por la combinación (sinérgico a aditivo) de los antimicrobianos sobre las diferentes cepas de *Nocardia brasiliensis*;

REFERENCIAS

- 1.-Lechevalier,H.A. Nocardiform Actinomycetes. En Bergey Manual of Systematic Bacteriology. Edit. Williams and Wilkins, Co.Tomo II. Baltimore, Md. 1989.
- 2.-Rippon, J., Willard P.H. Medical Mycology.The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 2a. Ed. W.B. Saunders Company.79-114.1982
- 3.-Bonifaz, A., Micología Médica Básica. 1a. Ed. Edit. Francisco Méndez Cervantes. México D.F. 135-160.1990.
- 4.-Tight Robert R.,Barlet, M.S. Actinomycetoma in the United States.Rev. Infect.Dis., 3 (6) :1139-1149.1981.
- 5.-González Ochoa A. and A. Vázquez-Hoyos. Aspectos Inmunológicos del Mictoma actinomicótico y la Nocardiosis. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx).13:177-187. 1953
- 6.- Mahgoub E.S.,Gumaa,S.A.,Immunological Status of mycetoma patients. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 1 :49-57.1977
- 7.- Bonifaz,A. Fung,O.Y, Función Leucocitaria de Polimorfonucleares en Pacientes con Mictoma Actinomicético .Dermatologia.Rev,Mex.32:171-174.1989
- 8.- Magaña,M. Mycetoma Int.. J. Derm. 23:221-236.1984.

- 9.- Gonazalez Ochoa A. Efectiveness of DDS in the treatment of chromoblastomycosis and of mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* in Therapy of Fungus Diseseses. : Little Brown Co. Boston 1955:321-327. 1984.
- 10.-Maderazo ,E.G., Quintallini,R.,Treatment of Nocardial Infection with Trimethoprim and Sulfametoxazole.The Am . Journ. Med.57:671-675.1974.
- 11.-Nitidandhaprabhas P., Duangota, S. Treatment of Nocardial Mycetoma with Trimethoprim and Sulfamethoxazole.Arch. Dermatol.111:1345-1348.1975.
- 12.-Maghoub, E.S. Medical management of mycetoma. Bulletin of WHO.54.303-311.1976
- 13.-Hubler W.R. Jr., Hubler E.R., Actinomycotic Mycetoma Treated with minocycline: case report. Tex. Med.72:79-83.1976
- 14.-Orfanakis,M.G.,Wilcox,H.G.,Smith,C.B. *In vitro* studies of the combined effect of amplicilin and sulfonamides on *Nocardia asteroides* and results of therapy in four patients.Antimicrob.Agents Chemother.28:716-721.1972
- 15.-Bach,MC., Gold, O.,Finland, M. Activity of Minocyclina against *Nocardia asteroides* : Comparison with Tetracycline in agar dilution and standard disk diffusion test and with sulfadiazine in experimental infection of mice.J. Lab. Clin.Med. 787-793.1973
- 16.-Bach,M.C.M.,Monaco,A.P,Finland,M.Pulmonary nocardiosis: Therapy with minocycline and ertitromycin plus amplicilin. J.Am.Med. Assoc. 224:1378-1381.1973

- 17.-Wallace, R.J., Jr. E.J Septimus, T.W, Williams, Jr. Use of Trimetoprim-sulfamethoxazole for treatment of infections due *Nocardia*. *Rev. Infect. Dis.* 4:315-325. 1982.
- 18.-Cockeril, F.R, Edson,R.S, Roberts,G.D Waldorf JD. Trimetoprim-Sulfamethoxazole resistant *Nocardia asteroides* causing multiple hepatic abscesses. Successful treatment with ampicillin, amikacin, and limited computed tomography-guided needle aspiration. *Am.J.Med.* 77:558. 1984.
- 19.-Welsh O. Mycetoma. Current Concepts in Treatment. *International Journal of Dermatology*. Vol 30, No. 6. June, 387-389. 1991.
- 20.-Bach.M.C., Sabath L.D., Susceptibility of *Nocardia asteroides* to 45 antimicrobial agents In vitro. *Antim Agents Chemother.* 3:1-8. 1973.
- 21.-Dalovisio.J.R., Punkey G.A., In vitro susceptibility of *Nocardia asteroides* to Amikacin. *Antimic. Agents Chemother.* 13:128-129. 1978.
- 22.-Southern P.M., Kutscher A.E., Susceptibility In vitro of *Nocardia* species to antimicrobial agents. *Diagn. Microbiol. Dis.* 8:119-122. 1978.
- 23.-Wallace.R.J., Septimus,E.J. Treatment of Experimental Nocardiosis in mice: Comparison of Amikacin and Sulfamide *J. Infec. Dis.* 140:244-248. 1979.

24.-Cynamon, M.H.,Palmer, G.S. In vitro susceptibility of *Nocardia asteroides* to N-fomimidoyl thienamycin and several cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:841-842.1981

25.-Gombert M.E ., Susceptibility of *Nocardia asteroides* to various antibiotics including newer betalactams, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin and N-fomimidoyl, thienamycin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 21:1011-1012.1982.

26.-García-Rdz.,J.A.,Gómez-García, A.C., Agüero, J., García Sánchez, J.E. In vitro susceptibility of *Nocardia* and *Rhodococcus* to fourteen B-lactam antibiotics. *Antimicrob. Chemother.* 10:564.1982.

27.-Wallace,R.J., Wiss.K., Diferences among *Nocardia* sp in susceptibility to aminoglycoside and beta-lactam antibiotics and their potential use in taxonomy. *Ant. Agents. Chemother.* 23:19-21.1983.

28.-Gombert,M.E., Alucino,T.M.,Synergism of imipenem and amikacin in combination with other antibiotics against *Nocardia asteroides* .*Antimicrob. Agents. Chemother.* 24:810-811.1983.

39.-Gutmann, L. Goldstein, F.W. Kitzis, M.D. Hautertort, B. Darmon, C., Acar, J.F. Susceptibility of *Nocardia asteroides* to 46 antibiotics, including 22 Beta-lactams. *Antimicrob.Agents. Chemother.* 23:248-251.1983.

30.-Dewsnup, D.H.& Wright, D.N. In vitro susceptibility of *Nocardia asteroides* to 25 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 25:165-167.1984.

- 31.-Gombert,M.E. Aulicino, T.M, du Bouchet, L, Silveman, G.E. Sheinbaum, W.M. Therpay of experimental cerebral Nocardiosis with Imipenem, Amikacin, Trimetoprim-Sulfametoxazole and minocycline. . Antimicrob. Agents Chemother. 30:270-273.1986.
- 32.-Gombert,M.E, Miles, E. Aulicino, Tary, M. Susceptibility of *Nocardia asteroides* to New Quinolones and Beta-lactams. Antimicrob. Agents Chemother .2013-2014.1987.
- 33.-Wallace.R.J., Septimus,E.J. Disk diffusion susceptibility testing of *Nocardia* species. The Journal of Infectious Dis.135(4):568-576. 1987.
- 34.-Boiron,P.,Provost,F. In vitro susceptibility testing of *Nocardia* spp and its taxonomic implication. Journal of Antimicrob Chemother.22:623-629.1988.
- 35.-Welsh,O., Saucedo, E., Amikacin alone and in combination with Trimethoprim-Sulfamethoxazole in the treatment of Actinomycotic mycetoma. J. Am. Acad. Dermatol. 17:443-448.1987.
- 36.-Berkey,P.,Moore,D. In vitro susceptibilities of *Nocardia* species to newer antimicrobial agents. Antimicrob. Agent.Chemother. 1078-1087. 1988.
- 37.-Yazawa,K.Y.,Mikami,K., Otozai,Arai,T. *In vitro* susceptibility *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* to aminoglycoside antibiotics, Chemotherapy. (Tokyo)36:28-34.1988.
- 38.-Bellido, F.,Pechère, J.C. Laboratory survey of Fluoroquinilone activity. Rev. Infect. Dis.; 11 Suppl 5(4):s917-24.1989

- 39.-Shih,K.C., Wang,F.D.,Liu,Y.C.,Liu,C.Y. Cutaneus abscess caused by *Nocardia brasiliensis*: report a case. Taiwan I Hsueh Hui , Tsa Chin, 88(11-12): 1156-9.1989.
- 40.-Yazawa,K.,Mikami,Y.,Uno,J. In vitro susceptibility of *Nocardia* spp. to a new floroquinolone, tosofluoxacin (T3262). Antimicrob. Agents. Chemother.,33(12):2140-1.1989.
- 41.-Yazawa,K., Mikami,Y., Uno, J. In vitro Activity of Flomoxef, a new oxacephem grupo antibiotic, agaisnt *Nocardia* in Comparison with other cephalosporins. J.Antimicrob. Chemother; 24(6): 921-5.1989.
- 42.-Harvey,R.J., Synergism in the folate parhway. Rev.Infect. Dis. 4:255-260.1982.
- 43.-Bowman,W.C., Rand,M.J. Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas.Aplicaciones Clinicas. Ed. Interamericana. 2a. Ed. Cap. 34. 34.1-34.44.1989.
- 44.-Mendel, G.L.,Sande, M.A. Antimicrobial Agents, sulfonamides, Trimetoprim-Sulfameoxazole and agents for urinary tract infection. In: Goodman, L.S, Gilman, A. eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed. New York. Mac Millan. 1095-114.1985.
- 45.-Lakae, J.A., The ribosome. Scientific American. 245(2):84-97.1981.
- 46.-Landau J.V.,Smith,W.P,Pope,D.H.,Role of 30S Ribosomal subunit Initiation Factors and specific ion concentration in Barotolerant Protein Synthesis in *Pseudomonas batycetes* . J.Bacteriol. 130(1): 154-159-1977.

- 47.-Nakae,R. Nake,T. Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Eschericia coli*. *Antimicrob. Agents, Chemother.* 22:554-559. 1982.
- 48.-Wallace.R.J., Steele, L., Susceptibility testing of *Nocardia* species for the clinical Laboratory Diagnostic. *Microb. Infect. Dis.* 9:155-166. 1988.
- 49.-Carrol.G.F.,Brown, J.M.A method for Determining In vitro Drug susceptibilities of some *Nocardiae* and *Actinomadurae*. *Am. Jour.Clin .Pathol.* 68(2):279-283. 1977.
- 50.-Norder.C.W.,Wentzel.H. Comparison of Techniqes for measurement of In vitro Antibiotic Synergism.*Journ.Inf.Dis.* 140:629-633. 1979.
- 51.-Khardori,N.,Shawar R. Gupta,R.,Rosenbaum, B. Rolston, K. *In vitro* susceptibilities of *Nocardia* species.*Antimicrob. Agents Chemother.* 37(4):882-4.1993
- 52.-Donald J, Krogstad M.D., Robert C., Moellering J.R., M.D. Combinations of Antibiotisc, Mechanisms of interaction against Bacteria. En *Antibiotic in Laboratory Medicine*. Second Edition. Victor Lorian Editor.1989.
- 53.-Hodohara,K.,Fujiyama,K.,Hirimitu,Y.,Sumuyoshi, K.,Hosoda S. Sugiura, H. Disseminated subcutaneous *Nocardia asteroides* abscess in a patient after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplatation.*,11(4):341-3.1993.
- 54.-Lo, W., Rolston, K.V.Use of Imipenem in the treatment of pulmonary nocardiosis. *Chest.* , Mar. 103(3):951-2.1993.

- 55.-Overkamp, D.,Waldmann,B.,Lins,T.Lingenfelter, T.,Petersen,D., Eggstein, M.Seccesful treatment of brain abcess caused by *Nocardia* in a immunocompromised patient after failure of cotrimoxazole.*Infection*. 20(6):365-6.1992
- 56.-King, CT.,Chapman, SW.,Butkuts, DE. Recurrent nocardiosis in a renal transplant recipient.*Southern Medical Journal*. 86(2):225-8 1993.
- 57.-Clenney Tl. Hammond,MD., McKeown,PP. Holt,DS.,Wallach,PM. Cardiac tamponade due to *Nocardia asteroides*. *Chest*.103(2):641-2. 1993.
- 58.-Yazawa,K.,Mikami,K.,Ohashi,S.,Miyaji,M.,Ichiara,Y.,Nishimura,C. *In vitro* activity of new carbapenem antibiotics: comparative studies with meropenem, L-627 and imipenem against pathogenic *Nocardia* spp.*Jorunal of Antimicrobial Chemother*.29(2):169-72. 1992.
- 59.-Garlando,F.,Bodmer, T.,Lee,C.,Zimmerli,W.,Pirovino,M.,Successful treatment of disseminated nocardiosis complicated by cerebral abscess with ceftriaxone and amikacine: case report. *Clinical Infectiounts Diseases*.15(6):1039-40.1992.
- 60.-Kjeltrom,J.A. Beaman,B.L. Development of a serologic panel for tne recongnition of nocardial infections in a murine model. *Diagnositic Microbiology & Infectious Disease*.16(4):291-301.1993.
- 61.-Ostrum,R.F. *Nocardia* septic arthritis of the hip with asociated avascular necrosis. A case report.*Clinical Orthopaedics & Related Research*. 288:282-6.1993.

- 62.-Freiberg, A. A. Herzenberg, J. E., Sangeorzan, J. A. Thorn synovitis of the knee joint with *Nocardia pyarthrosis*. *Clinical Orthopedics & Related Research*. 278:233-6.1993.
- 63.-Borges, A. A. Kransnow, S. A., Waldeigh, R. G., Cohen, M. H. Nocardiosis after corticosteroid therapy for malignant thymoma. *Cancer*. 171(5):1746-50.1993.
- 64.-el-Khawand, C. Installe, E., Pouthier, F., Trigaux, J. P., Delaunois, L. Nocardiosis. Apropos of case report. Literature review. *Acta Clinica Belgica*. 47(6):414-22.1992..
- 65.-Kohbata, S., Shimokawa, K. Circulating antibody to *Nocardia* in the serum of patientes with Parkinson's disease. *Advances in Neurology*. 60:355-7.1993.
- 66.-Phillips, W. B. Shields, J. A., Eagle R. C. Jr. Masciulli, L., Yarian, D. L. *Nocardia* choroidal abscess. *British Journal of Ophthalmology*. 76(11):694.6.1992.
- 67.-Sachs. M. K., Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection acquired from a cat scratch: case report and review(Review). *Clinical Infectious Diseases*, 15(4):710-1.1992.
- 68.-Koll, B. S., Brown A. E., Kiwhn, T. E., Armostrong D. Disseminated *Nocardia brasiliensis* infection with septic arthritis (Review). *Clinical Infectious Diseases*. 15(3):469-72.1992.

