

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION DE ANTIMICROBIANOS IN VITRO
E IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DEL
MICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*

Por

M.C.P. ALEJANDRA GOMEZ FLORES

Director de tesis: Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera
Co-directores: Dr. med. Oliverio Welsh Lozano
Dr. Sc. Mario C. Salinas Carmona

Como requisito para obtener el grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Agosto, 2004

2004

TD
Z6658
FM
2004
.G6

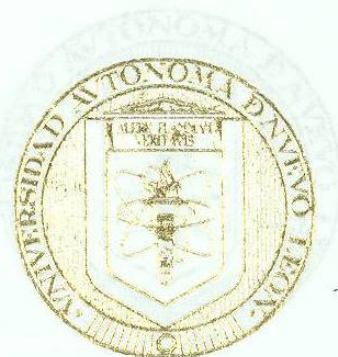
M.C.F. ALFJANDRA COMIEZ FLORES



1020150068

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



GT
82245
HJ
6006
20.

EVALUACION DE ANTIMICROBIANOS IN VITRO
E IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DEL
MICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*

Por

M.C.P. ALEJANDRA GOMEZ FLORES

Director de tesis: Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera
Co-directores: Dr. med. Oliverio Welsh Lozano
Dr. Sc. Mario C. Salinas Carmona

Como requisito para obtener el grado de
DOCTOR EN MEDICINA

Agosto, 2004

41509

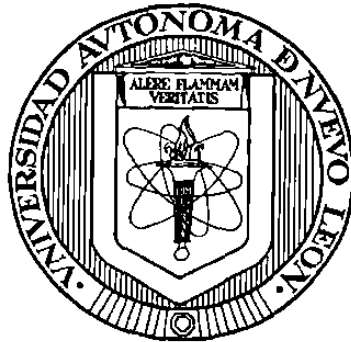
TD
Z 665X
FM
2004
.E6



FONDO
TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS IN VITRO E IN VIVO PARA EL
TRATAMIENTO DEL MICETOMA POR *Nocardia brasiliensis***

Por

M.C.P. ALEJANDRA GÓMEZ FLORES

**Director de tesis: Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera
Co-directores: Dr. med. Oliverio Welsh Lozano
Dr. Sc. Mario C. Salinas Carmona**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Agosto, 2004

**"EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS IN VITRO E IN VIVO
PARA EL TRATAMIENTO DEL MICETOMA
POR *Nocardia brasiliensis*"**

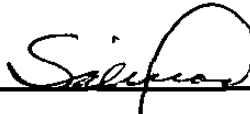
Aprobación de la Tesis:



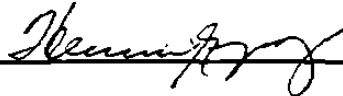
Dr. Lucio Vera Cabrera
Director de Tesis



Dr. Oliverio Welsh Lozano
Co-Director de Tesis



Dr. Mario César Salinas Carmona
Co-Director de Tesis



Dra. Herminia Martínez Rodríguez



Dr. Gerardo Velazco Castañón



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Sub-Director de Investigación y Estudios de Postgrado

**“EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS IN VITRO E IN VIVO
PARA EL TRATAMIENTO DEL MICETOMA
POR *Nocardia brasiliensis*”**

Presentado por:

M.C.P. Alejandra Gómez Flores

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, bajo la asesoría del Dr. Lucio Vera Cabrera y la Co-asesoría del Dr. Oliverio Welsh Lozano y del Dr. Mario César Salinas Carmona.

Director:



Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera

Co-Director:



Dr. med. Oliverio Welsh Lozano

Co-Director:



Dr. Sc. Mario C. Salinas Carmona

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de mi vida y el permitirme llegar a este momento.

A mis padres Alberto A. Gómez Gaytán y Minerva Flores Ríos por darme su amor, y su siempre apoyo incondicional para lograr haber estudiado una carrera, realizar una especialidad y ahora un doctorado.

A mi esposo Adrián M. Morantes Carvajal por su amor, confianza y apoyo para la realización de nuestra vida juntos.

A mis hijos Adrián y Sofía Alejandra por ser la bendición más grande de Dios.

A mi hermana, amiga y profesora Minerva Gómez Flores por su amor, enseñanzas y consejos.

A mi hermano Enrique J. Gómez Flores por ser un ejemplo y por su siempre total apoyo.

A mis hermanos Alberto, Adriana, Laura, Conchis y Lila por su amor y ser un ejemplo para mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme bendecido tanto, y permitirme llegar hasta hoy.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera asesor de mi tesis, por su gran apoyo, su tiempo, su paciencia, su amistad y sus consejos, así como el haber dirigido este proyecto con gran inteligencia y disciplina.

Así como al Dr. med. Oliverio Welsh Lozano co-asesor, por su apoyo, sus consejos y su amistad ya que es un ejemplo siempre para mí a seguir.

Al Dr. Sc. Mario César Salinas Carmona co-asesor, por sus valiosas sugerencias e interés, en la realización del presente trabajo, así como su apoyo y amistad.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez y al Dr. Gerardo Velazco Castañón por su colaboración y asesoría en este trabajo.

A mi hermana, amiga y profesora, la Dra. Minerva Gómez Flores por sus consejos e invaluable y desinteresado apoyo, ejemplo para mí como profesional y persona.

A mis profesores el Dr. Juventino González, Dr. Jorge Ocampo, Dr. Sergio González y Dr. Gildardo Jaramillo por sus enseñanzas y ejemplo.

También quiero agradecer a la Q.F.B. Wendy Escalante Fuentes por su gran amistad y apoyo desinteresado en la realización de este trabajo.

A mis compañeras Graciela Guerrero, Adriana Pizaña y Evangelina González por su amistad y ayuda.

A mis padres Sr. Alberto Gómez Flores y Sra. Minerva Flores Ríos por su grandes enseñanzas de disciplina, esfuerzo, estudio y dedicación que sin ello no hubiera logrado nada de lo que soy hoy, gracias por ser mis padres y su apoyo incondicional.

A mi esposo Adrián por el apoyo moral que siempre me ha brindado, sus consejos que siempre me han ayudado a seguir y no rendirme. A mis niños Adrián y Sofía por ser el regalo más grande de Dios y que solo con su existencia me dan apoyo y alegría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. (CONACYT)

Al Programa de Apoyo a la Ciencia y Tecnología de la U.A.N.L. por el apoyo económico otorgado (PAICYT)

Al Dr. Salvador Said Fernández y al Dr. Héctor Lozano Garza del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por permitirme el uso de su equipo y su gran ayuda en el desarrollo de este estudio.

Y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Definición	1
1.3 Etiología	2
1.4 Epidemiología	3
1.5 Fisiopatología	4
1.6 Diagnóstico	5
1.7 Tratamiento	6
1.8 Ensayos <i>in vitro</i>	13
1.9 Hipótesis	19
1.10 Objetivos del Trabajo	19
1.10.1 Objetivo General.	19
1.10.2 Objetivos Particulares.	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
2.1 Microorganismos	20
2.2 Preparación del inóculo.	21
2.3 Ensayos de susceptibilidad.	22
2.3.1 Ensayo de difusión en disco.	22
2.3.2 Técnica de microdilución en caldo	24
2.3.3 Determinación de la sensibilidad de cepas de <i>N. brasiliensis</i> a combinaciones de drogas por análisis cruzado	26
2.4 Producción experimental de micetoma en ratones BALB/c	28
3. RESULTADOS	30
3.1 Resultados obtenidos en la técnica de difusión en disco	30
3.2 Antimicrobianos utilizados en la técnica de microdilución en caldo	34
3.3 Resultados obtenidos por la técnica de microdilución en caldo	34
3.4 Resultados obtenidos de los ensayos de combinación de drogas	44

Capítulo	Página
3.5 Producción de micetoma experimental. . . .	46
3.6 Resultados obtenidos en los estudios in vivo. .	47
4. DISCUSION	51
5. CONCLUSIONES	65
6. REFERENCIAS	66

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Actinomicetos utilizados en los estudios de sensibilidad por difusión en disco.	21
II. Grupos de antimicrobianos utilizados en los estudios in vitro por la técnica de difusión en disco con los valores para su interpretación	31
III. Resultados del porcentaje de actividad de los antimicrobianos probados por la técnica de difusión en disco . . .	33
IV. CMI ₅₀ y CMI ₉₀ por la técnica de microdilución en caldo	36
V. Resultados obtenidos de la combinación de drogas . . .	45
VI. Lectura de la producción de micetomas a los 90 días postinoculación en los diferentes grupos	49
VII. Análisis estadístico de los ensayos de terapia in vivo . .	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Arreglo de las diluciones de los antimicrobianos de acuerdo a la técnica en tablero	27
2. Valoración de los efectos de las combinaciones antibacterianas de acuerdo al método de tablero	28
3. Resultados de los CMI contra el porcentaje de cepas inhibidas entre los aminoglucósidos activos	38
4. Resultados de los CMI contra el porcentaje de cepas inhibidas entre los antimicrobianos nuevos activos y amikacina	39
5. Resultados de los CMI contra el porcentaje de cepas inhibidas entre los aminoglucósidos menos activos en comparación con amikacina	40
6. Comparación de los halos de inhibición contra los CMI de cada antimicrobiano en 32 cepas en aquellos en donde los halos de inhibición están por arriba de 20mm	42
7. Comparación de los halos de inhibición contra los CMI de cada antimicrobiano en 32 cepas en aquellos en donde los resultados son moderadamente dispersos	43
8. Comparación de los halos de inhibición contra los CMI de cada antimicrobiano en 32 cepas en aquellos en donde los resultados son bastante dispersos	44
9. Estadificación de los micetomas en diferentes etapas	47
10. Esquema de los resultados de la prueba estadística ANOVA	50

NOMENCLATURA

AMK	Amikacina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DDS	Diamino difenil sulfona
ELISA	Inmunoensayo unido a enzimas
kDa	Kilodaltons
NCCLS	Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico
PABA	Ácido para-aminobenzoico
RNA	Ácido ribonucleico
SXT	Trimetoprim - Sulfametoxazol

RESUMEN

Alejandra Gómez Flores

Fecha de obtención del

grado : Agosto 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio : EVALUACIÓN DE ANTIMICROBIANOS IN VITRO E IN VIVO PARA EL TRATAMIENTO DEL MICETOMA POR *Nocardia brasiliensis*.

Número de páginas: 72

Candidato para el grado de
Doctor en Medicina

Área de estudio: Dermatología

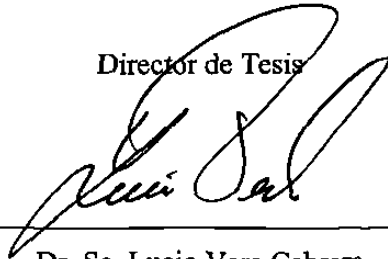
En México, el micetoma es causado principalmente por *Nocardia brasiliensis*, que produce aproximadamente el 86% de los casos. El tratamiento de esta enfermedad ha variado a través del tiempo siendo de elección los antimicrobianos pertenecientes al grupo de las sulfonamidas, y de estos la combinación trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) ha demostrado ser la más efectiva. En los casos resistentes, extensos ó que ponen en riesgo la vida se combina el SXT con amikacina, que es una droga perteneciente al grupo de los aminoglucósidos. Esta combinación presenta una efectividad en más del 90% de los casos, sin embargo existen reportes de casos resistentes a esta combinación ó bien pacientes no candidatos a esta terapéutica por los efectos colaterales. Cada vez existe más interés en la búsqueda de otros antimicrobianos con actividad sobre *Nocardia brasiliensis*. El objetivo del presente estudio fué evaluar la susceptibilidad in vitro e in vivo de cepas de *Nocardia brasiliensis*, aisladas de pacientes con micetoma, a diversos antimicrobianos. Los estudios in vitro se realizaron en 32 cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma diagnosticados en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González"; Como primer estudio de monitoreo de sensibilidad in vitro se determinó, por la técnica de difusión en disco, la actividad de 44 antimicrobianos incluyendo aminoglucósidos, cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, macrólidos y algunos otros. En estos ensayos observamos que algunos antimicrobianos presentaron una actividad en más del 66% de las cepas, y sus resultados se confirmaron cuantitativamente por el método de difusión en disco. Posteriormente realizamos ensayos de combinación de drogas mediante análisis cruzado de los antimicrobianos más activos. Como la actividad in vitro no correlaciona necesariamente con lo observado in vivo se desarrollaron estudios en ratones hembra BALB/c de los antimicrobianos más activos.

Contribuciones y Conclusiones: En los ensayos de sensibilidad por la técnica de difusión en disco obtuvimos una sensibilidad en el 100% de las cepas al linezolid, gatifloxacina, moxifloxacina, amikacina, gentamicina, isepamicina, netilmicina y tobramicina, y una sensibilidad mayor del 66% a minociclina, amoxicilina-AC, ticarcilina-AC, nitroxolina, SXT y espiramicina. Estos resultados se confirmaron de manera cuantitativa por el método de microdilución en caldo. En los ensayos de

combinaciones de drogas se ensayaron 4 combinaciones: 1.- SXT + amikacina esta combinación es la más utilizada en la clínica, 2.- SXT + amoxicilina-AC, 3.- linezolid + SXT y 4.- linezolid + amoxicilina-AC, no observándose en ninguna efecto antagónico y teniendo mayor efecto sinérgico en las combinaciones de linezolid + SXT y SXT + amoxicilina-AC. En los estudios in vivo se analizaron por separado el efecto de la amikacina, amoxicilina-AC y linezolid, las cuales son las drogas que se han utilizado con éxito en el tratamiento de pacientes; fué linezolid el que presentó la mejor actividad in vivo, seguido por amoxicilina-AC y amikacina.

Mediante este estudio reiteramos que es de gran importancia la realización de estudios in vitro para conocer la sensibilidad de las cepas de *Nocardia brasiliensis* causantes de micetoma. Los grupos de aminoglucósidos, el SXT y amoxicilina-AC fueron de los antimicrobianos con mayor actividad como ya se había reportado previamente, pero existen otros como el linezolid, la gatifloxacina y la moxifloxacina que también tienen gran actividad y cuyos efectos colaterales son mínimos, por lo que podrían ser efectivos en el tratamiento de actinomicetomas por *Nocardia brasiliensis*. Se deja la tarea importante del estudio de estas drogas y sus combinaciones para encontrar mejores tratamientos, para esta enfermedad.

Director de Tesis



Dr. Sc. Lucio Vera Cabrera

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El micetoma fué descrito por primera vez en 1842, por Gill en la región de Madura, India (15); sin embargo, fué Godfrey quien reportó los primeros 4 casos en 1846 llamandolo "*morbis tuberculosis pedis*" (15). En 1860, Carter lo nombra micetoma "tumor por hongos" al demostrar su etiología secundaria a la infección por hongos (7,8). Pinoy, en 1913, subdivide el micetoma de acuerdo a su etiología en dos grupos: actinomicetomas causados por bacterias, y eumicetomas causados por hongos verdaderos (26). El primer caso en México lo reportó Cicero en 1902 (21)

1.2 Definición

Esta enfermedad es una dermatosis inflamatoria crónica que afecta la piel, el tejido celular subcutáneo, músculo y hueso; en ocasiones puede diseminarse por continuidad y afectar órganos subyacentes (27, 38). La

infección resulta de la inoculación traumática del microorganismo causal en la dermis ó en el tejido celular subcutáneo a través de una herida causada por una espina ó astilla. El padecimiento se inicia como un nódulo indoloro y pétreo en el sitio de la lesión el cual crece lentamente y eventualmente se vuelve purulento y necrótico. En etapas posteriores se forman múltiples nódulos adicionales produciendo aumento de volumen y deformidad del área afectada (27, 40). Otra característica de la enfermedad es la formación de tractos fistulosos a través de los cuales drena un material filante serosanguinolento ó seropurulento que contiene los granos formados por microcolonias del agente infeccioso. El tamaño y color de los granos depende del agente causal.

Las lesiones generalmente son localizadas y se extienden por continuidad a los tejidos involucrando con el tiempo el músculo y huesos adyacentes; en algunos de los casos se produce una osteomielitis destructiva. En México, el 75% de los casos se presentan en extremidades inferiores (44% en el pie), 10% en los superiores y el 10% en el tronco. La extensión por vía linfática ó hematógica es muy rara (22).

1.3 Etiología

Los agentes del micetoma son saprófitos, se encuentran en la

naturaleza en el suelo, en la madera, en vegetales y en espinas (v.gr. arbustos del tipo acacia).

En México el 98% de los micetomas son causados por actinomicetos. De ellos *Nocardia brasiliensis* es el agente causal del 86% de los casos, *Actinomadura madure* el 8% y *Streptomyces somaliensis* el 4%. El 2% restante es causado por eumicetos (hongos) principalmente *Madurella mycetomatis* y *Madurella grisea* (22).

Nocardia brasiliensis fué descrita originalmente en 1913 por Pinoy (26), y es una bacteria del orden actinomicetales, de la familia Nocardiaceae. El género *Nocardia* está filogenéticamente relacionado a otros actinomicetos patógenos para el humano pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, y *Tsukamurella*. Los microorganismos pertenecientes a *Nocardia* son gram positivos, no móviles, parcialmente ácido-alcohol resistentes, intracelulares facultativos, aeróbicos, que presentan una extensa ramificación celular, cuyos filamentos fragmentan en formas cocoides ó bacilares (2, 43).

1.4 Epidemiología

El micetoma se presenta en ambos sexos, predominando en pacientes del sexo masculino en una relación de 4:1 (22, 27, 40); es más frecuente entre

la segunda y cuarta década de la vida, existiendo casos reportados en niños y ancianos. Su incidencia es mayor en áreas rurales y los campesinos son los más afectados por su misma ocupación y la falta de zapatos, lo cual facilita los traumatismos en los pies.

La prevalencia de los agentes causales varía, siendo más frecuente en los países que se encuentran alrededor del trópico de Cáncer (Latitud 15°S y 30°N) con climas tropicales y subtropicales. El mayor número de casos reportados han sido en India; en África predomina en Sudán, Senegal y Somalia; En América se distribuye en Centro América, México, Venezuela, Colombia y Brasil (18, 20). En México los casos reportados predominan en los estados de Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Guerrero, Hidalgo y Nuevo León (22).

1.5 Fisiopatología

Los mecanismos de patogenicidad de los actinomicetos así como los mecanismos de resistencia del hospedero aún no están bien claros. Por estudios realizados se ha demostrado que tanto la inmunidad humoral como la celular intervienen en la resistencia a la infección, siendo la inmunidad celular la que parece tener una participación más importante en la defensa del hospedero (2, 12).

1.6 Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de las infecciones causadas por microorganismos del género *Nocardia* se realiza determinando la presencia del agente etiológico mediante varios exámenes de laboratorio como son el examen directo de las muestras, el estudio anatomopatológico, el cultivo microbiológico y la realización de pruebas bioquímicas a las colonias del agente causal obtenido en cultivo (43, 32).

Pruebas inmunológicas: Los antígenos extracelulares de *N. brasiliensis* han sido investigados más recientemente por su potencial diagnóstico, identificándose algunos antígenos somáticos poco específicos que al utilizarse en pruebas intradérmicas han mostrado reactividad cruzada con otros actinomicetos (28). En 1992 Salinas y cols. identificaron mediante la técnica de Western blot tres antígenos inmunodominantes de 61-, 26-, y 24-kDa de peso molecular que fueron reconocidos por sueros de pacientes con micetoma (29). Estos antígenos fueron posteriormente aislados y purificados (34). Con el antígeno de 24-kDa se ha estandarizado una técnica de ELISA, con la cual es posible identificar pacientes infectados e inclusive determinar la eficiencia de la terapia, ya que en pacientes completamente curados la prueba de ELISA resulta negativa (30).

1.7 Tratamiento

En el tratamiento de los micetomas actinomicéticos, se han utilizado diversos esquemas de antimicrobianos a través de la historia, destacando las sustancias que se mencionan a continuación.

Las sulfonamidas: Estas sustancias son un grupo de antimicrobianos que actúan en el metabolismo de los folatos de bacterias susceptibles, antagonizando competitivamente con el ácido para-aminobenzoico (PABA) (10). Dentro de este grupo de antimicrobianos se encuentran la sulfanilamida, la diaminodifenilsulfona (DDS), el sulfisoxazol, la sulfametoxipiridazina y el sulfametoxazol. En 1941 se obtuvo el primer reporte de un caso de micetoma pedis tratado con sulfanilamida con buenos resultados (12). En 1945, Peters reportó otro caso de micetoma por *N. brasiliensis* tratado exitosamente con sulfadiazina (50). Los buenos resultados de tratamiento de la lepra con DDS condujeron a una amplia investigación del tratamiento de los actinomicetomas con sulfas. En 1948, se reconoció a las sulfonamidas como el tratamiento de elección para las infecciones por *Nocardia* (23). En 1950, en México, García M. reportó el primer caso curado de micetoma por *N. brasiliensis* con DDS (13) siendo confirmado en este mismo año por Latapí y cols. (21). En 1952, González Ochoa fue el primero que comprobó la efectividad de estos antimicrobianos

in vitro. En 1954, Latapí y Lavalle reportaron un grupo de actinomicetomas tratados exitosamente con DDS. En los últimos 20 años el trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), introducido en E.U.A. en 1973, se ha convertido en el tratamiento estándar de los actinomicetomas con un 60 a 70 % de efectividad (41). Este medicamento combina una sulfonamida con una diamino-pirimidina la cual inhibe selectivamente la dehidrofolato reductasa en el metabolismo de los folatos por lo que al combinarse con la sulfonamida se potencian sus acciones en etapas sucesivas de la misma vía enzimática (23).

Tetraciclinas: Descubiertas por Peabody en 1948 (40), el primero de estos compuestos para su utilización clínica fue la clorotetraciclina. Las tetraciclinas son un grupo de antimicrobianos con propiedades bacteriostáticas; su mecanismo de acción más importante es bloquear la unión del complejo aminoácido-RNA de transferencia, dando como consecuencia la falta de aminoácidos durante la traducción del RNA mensajero, impidiendo así la síntesis de proteínas. La vía oral es la forma de administración más frecuente. Las tetraciclinas se dividen en dos grupos: a) el grupo de acción corta, compuesto por la oxitetraciclina que se une en un 20% a las proteínas plasmáticas, y b) el grupo de acción larga, compuesto por doxiciclina y minociclina que se une en un 80% a las proteínas

plasmáticas (19).

Todas las tetraciclinas se excretan por vía renal principalmente por filtración glomerular y en menor proporción por vía biliar y heces. Las tetraciclinas tienen un amplio espectro antimicrobiano ya que actúan contra cocos y bacilos gram positivos y gram negativos, principalmente enterobacterias (19).

Estos antibióticos se han utilizado con éxito en el tratamiento de actinomicetomas por *N. brasiliensis*, *N. asteroides*, *A. madure*, y *A. pelletierii* (41, 42). Más recientemente, en 1996, Brown y cols. reportaron dos nuevas tetraciclinas semi-sintéticas: la N,N-dimetilglicilamido-minociclina y N,N-dimetilglicilamido-6-dimetil-6-deoxi-tetraciclina con efectos terapéuticos in vitro sobre bacterias del género *Nocardia* (6), aunque su uso en el tratamiento de casos de micetoma no se ha reportado.

Estreptomycin: La estreptomycin es un aminoglucósido aislado de *Streptomyces griseus* por Waksman en 1943 (40). Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas al fijarse a proteínas ribosómicas específicas de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Su efecto terapéutico en actinomicetos se reportó en 1957 por Ziprkowski y cols. (50). En 1976 Mahgoub y cols (24) reportaron su utilización en 144 pacientes con actinomicetomas con diferentes esquemas de estreptomycin

en combinación con otros antibióticos (estreptomicina-SXT, estreptomicina-DDS, estreptomicina-rifampicina) obteniendo la curación del 63% de los pacientes y una mejoría importante del 30% de los pacientes. La combinación estreptomicina-SXT presentó la mayor cantidad de pacientes curados (24) .

Isoniazida: La isoniazida es otro antimicrobiano con propiedades bactericidas que ha sido utilizado en el tratamiento de actinomicetomas. El fármaco interfiere con la biosíntesis de los ácidos nucleicos, los lípidos de la membrana y la glucólisis de la bacteria. Inhibe la síntesis de ácidos micólicos, componentes principales de la pared celular de *Nocardia* al interferir en la síntesis de la enzima micolasa. La isoniazida se absorbe en el intestino, se acetila en el hígado y se excreta por la orina. En 1954, se reportó su utilización en cinco casos de micetomas actinomicóticos sin combinación con algún otro antimicrobiano presentando cura en dos casos y mejoría importante en uno (21).

Rifampicina: Es un derivado semi-sintético de la rifampicina B obtenida de *Nocardia mediterranei* que actúa inhibiendo la DNA polimerasa bacteriana. La rifampicina se ha utilizado como tratamiento de actinomicetomas en diferentes esquemas en combinación con otros antimicrobianos teniendo resultados favorables (40, 44). Su administración

es por vía oral, y es metabolizada en el hígado.

Sus efectos colaterales se pueden presentar de forma muy variable como exantema, fiebre, náuseas, vómito, síndrome cutáneo, hepatitis tóxica etc.

Amikacina: Este compuesto se sintetizó en 1972 y al igual que la estreptomicina pertenece al grupo de los aminoglucósidos. La amikacina tiene una acción bactericida con un amplio espectro antimicrobiano. Se fija a proteínas ribosómicas específicas de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas por tres mecanismos diferentes: a) Impide el comienzo de la síntesis de proteínas, b) Impide el alargamiento de la cadena polipeptídica y c) Aumenta la frecuencia de lecturas erróneas del código genético, lo cual da como resultado la síntesis de proteínas estructuralmente anormales (25). La vía de administración idónea es la parenteral ya que por vía oral se inactiva por el pH ácido, la amikacina es excretada sin metabolizarse por filtración glomerular. Varios autores han reportado sobre su efecto inhibitorio in vitro en cultivos de *Nocardia*; (1, 35) su efecto terapéutico in vivo se ha probado en infecciones inducidas experimentalmente en modelos murinos de infección con *Nocardia asteroides* (36).

En 1985, Welsh y cols. reportaron un caso de un paciente con actinomicetoma de diseminación pulmonar en el que se logró la curación

después de 5 semanas de tratamiento con SXT 7-35 mg/día respectivamente y tres semanas con amikacina 500 mg cada 12 hrs. IM (38). Posteriormente, el mismo autor en 1987 reportó una respuesta exitosa en nueve casos de actinomicetomas, 2 tratados con amikacina como tratamiento único y 12 combinando SXT y amikacina (39). En 1989 reportó otro estudio de 26 pacientes con actinomicetoma respondiendo favorablemente con curación 21 de ellos al primer ó segundo ciclo y 5 después de tres ciclos (15 semanas de tratamiento) (40). Este régimen terapéutico actualmente se indica en actinomicetomas severos y extensos, que no responden al tratamiento tradicional ó que presentan riesgo de diseminación a órganos ó estructuras vitales. Está relativamente contraindicado en pacientes con problemas hepáticos, óticos ó renales. Los efectos colaterales de estos medicamentos son diferentes reacciones cutáneas alérgicas, exantema, fiebre con eosinofilia, nefrotoxicidad reversible, ototoxicidad irreversible, bloqueo neuromuscular y apneas neonatales.

Amoxicilina-Acido Clavulánico. La amoxicilina es una aminopenicilina con actividad antibacteriana intrínseca; su acción consiste en inhibir la síntesis de la pared bacteriana, tiene como desventaja su inactivación por bacterias que producen beta-lactamasas; en el plasma se une en 20% a proteínas y se excreta por vía renal. Sus efectos de toxicidad

se presentan con diarrea en 1 a 3 %, exantema, nefropatía, trastornos hematológicos y convulsiones.

El ácido clavulánico por sí solo tiene una actividad antibacteriana escasa y su importancia radica en su capacidad de inhibir en forma irreversible y progresiva a varias enzimas al inactivar su sitio de acción. Dicho efecto es más notorio en las beta-lactamasas II, III, IV y V (penicilinasas) y en las producidas por estafilococos (II, IV) (19). Su absorción por vía intestinal es buena, se metaboliza en el hígado y se excreta por vía renal. Los efectos colaterales reportados son de naturaleza gastrointestinal como diarrea, náuseas, vómitos y reacciones alérgicas con prurito y eosinofilia. En 1987 Wallace reportó resistencia B-lactámica de *N. brasiliensis* inhibida con la utilización de ácido clavulánico (37).

En 1993 Wortham reportó un caso de un paciente con micetoma en el pie que involucraba el hueso, quien fué tratado inicialmente de forma favorable con amikacina - SXT por 14 semanas, dicho paciente desarrolló disminución subclínica de la agudeza auditiva por lo que se decidió cambiar el tratamiento de forma alternativa con amoxicilina-ácido clavulánico por 6 meses, con curación (45). En 1993, en México Saúl y Bonifaz reportaron dos casos de micetomas tratados exitosamente con amoxicilina-ácido clavulánico (31). Uno de ellos era un paciente con micetoma en la rodilla

tratado anteriormente con DSS y SXT por 7 meses, rifampicina por 1 mes, y 3 ciclos de amikacina; el segundo paciente presentaba un micetoma en el brazo y hombro izquierdo sin antecedente de tratamientos previos. Welsh posteriormente reportó tres casos con resultados variables (40), uno de estos casos se trataba de un paciente con micetoma en el tórax, el cual fue tratado inicialmente con amoxicilina-ácido clavulánico a dosis de 1.5g. con mejoría importante durante el primer mes, pero con retorno de las lesiones a los tres meses de iniciado el tratamiento. Los otros dos casos de actinomicetomas se trataron inicialmente sin éxito con SXT y amikacina y después de tres ciclos, se cambió el esquema con amoxicilina-ácido clavulánico sin presentar mejoría clínica ni bacteriológica.

1.8 Ensayos in vitro

Con el paso del tiempo, que puede ser muy variable de 1 mes a 1 año se puede presentar resistencia a los antimicrobianos. Por ello se han realizado en diversas partes del mundo, estudios in vitro sobre la susceptibilidad de los actinomicetos, obteniéndose resultados variables.

En 1976, Gary G. Carroll y cols. en Atlanta Georgia reportaron un estudio de susceptibilidad por el método de dilución en agar de 17 antibióticos en 33 cepas de *Nocardia*, 7 cepas eran de la especie *N.*

brasiliensis, las cuales mostraron una mayor sensibilidad a SXT, sulfisoxazol, ampicilina, doxiciclina, minociclina, y gentamicina entre otros (14).

En 1977, Wallace y cols. realizaron un estudio de susceptibilidad en 51 cepas de *Nocardia spp.* por el método de dilución en agar, y difusión en disco, observando una sensibilidad a la amikacina en el 90% de las cepas. Para el SXT y el sulfisoxazol se observó una actividad importante, aunque se requirió para su estudio menor cantidad de inóculo bacteriano, con una buena correlación entre las dos técnicas (CMI vs halos de inhibición en disco) (35).

En 1988, Boiron y cols., probaron in vitro 16 antimicrobianos en 28 cepas de *Nocardia* de 4 especies encontrando que en 6 de ellas existía susceptibilidad a amikacina, gentamicina y minociclina. (5).

En 1988, Berkey reportó, en un estudio que incluía 31 cepas de *Nocardia spp.*, mediante la técnica de dilución en agar que en 4 cepas pertenecientes a *N. brasiliensis* existía susceptibilidad a una nueva carboxi-quinolona PD-117558 y una moderada susceptibilidad a ciprofloxacina (3).

En 1989, Yazawak y cols., probaron por el método de dilución en agar en 111 cepas de *Nocardia spp.* susceptibilidad a una nueva

fluoroquinolona, la tosufloxacin con una actividad de 2 a 20 veces mayor que otras quinolonas (46). Posteriormente este mismo autor en 1989 probó un nuevo antibiótico del grupo del oxacephem (Flomoxef) contra 113 cepas de 5 especies de *Nocardia* y comparó su actividad con otras cefalosporinas, utilizando la técnica de dilución en agar, y resultó tener una potencia de 2 a 50 veces mayor siendo *N. brasiliensis* moderadamente susceptible (47). En 1991, Yazawak comprobó que *N. brasiliensis* era resistente a kanamicina, debido a la producción de una enzima aminoglucósido 3-transferasa (48). Y en 1992, este autor determinó la CMI de 2 nuevos antibióticos del grupo de carbapenemes (meropenem y L-627) en comparación con el imipenem encontrando que en *N. brasiliensis* el meropenem resultó ser más activo que el imipenem con una CMI de 28.3-53.3 µg/ml (49).

En 1995, Durán en Argentina estudió la susceptibilidad in vitro por las técnicas de difusión en disco y caldo de 13 cepas obtenidas de pacientes con micetomas, 11 cepas de *N. brasiliensis* y 2 cepas de *N. asteroides*. Las cepas de *N. brasiliensis* presentaron susceptibilidad a SXT, tetraciclina, gentamicina y amikacina. En general 61% de las cepas mostraron sensibilidad a cefotaxima y ciprofloxacina, con moderada susceptibilidad a penicilina, ampicilina y eritromicina (11).

En 1996, Biehel y cols. en Omaha, Nebraska reportaron un estudio de

susceptibilidad *in vitro* por la técnica de difusión en disco y dilución en caldo en 52 cepas de *Nocardia*: 27 *N. asteroides*, 13 *N. farcinica*, 4 *N. nova* y 3 *N. brasiliensis*, presentando mayor susceptibilidad a minociclina en un 98%, seguido por SXT con 93%, amikacina 83%, e imipenem con 71% (4).

En 1997, Chaudhuri en India reportó resistencia a cotrimoxazole, estreptomicina y ampicilina y susceptibilidad a amikacina y ciprofloxacina en un estudio en cepas de *Nocardia* por el método de dilución en agar y difusión en disco (9).

En 1997, Ambaye y cols. de la Clínica Mayo en Rochester Minnesota reportaron los resultados de otro estudio *in vitro*, de susceptibilidad de cepas de *N. asteroides* a algunos antimicrobianos encontrándose mayor susceptibilidad a los siguientes antimicrobianos amikacina, SXT y menor susceptibilidad a, minociclina, imipenem, ceftriaxona, amoxicilina-ácido clavulánico, ciprofloxacina, ampicilina, y eritromicina.

Con los antecedentes antes citados, podemos analizar la terapéutica utilizada a través del tiempo para infecciones por *Nocardia* y el interés cada vez mayor en la búsqueda de otros antimicrobianos con actividad contra cepas de *Nocardia brasiliensis*. De estos estudios podemos concluir que las bacterias presentan diferencias de susceptibilidad entre diferentes regiones

del mundo y que la mayor parte de la investigación se ha centrado sobre las especies del complejo *N. asteroides* (35,5,6), cuyos resultados obtenidos no se extrapolan necesariamente a *N. brasiliensis*. En la mayor parte de los estudios se han utilizado pocas cepas de *N. brasiliensis* y/o pocos antimicrobianos por lo que es importante analizar otros antimicrobianos en una mayor cantidad de cepas autóctonas.

Para lograr lo anterior, se propuso la realización de ensayos de sensibilidad in vitro de *N. brasiliensis* utilizando los métodos de difusión en disco y la técnica de microdilución en caldo con una gran variedad de antimicrobianos para determinar los patrones de sensibilidad de cepas obtenidas en México.

Desde el punto de vista terapéutico, el tratamiento para infecciones por *Nocardia* parece ser más efectiva cuando se combinan varios antimicrobianos. En este tipo de bacterias es probable que las tasas de mutación sean altas tal como se ha observado en *Mycobacterium tuberculosis* (2), por lo tanto, es importante determinar el efecto de la combinación de los antimicrobianos mas efectivos mediante estudios in vitro.

Los efectos de los antimicrobianos in vitro, pueden no suceder in vivo, ya que las condiciones del medio de cultivo son muy diferentes

comparados con la de los tejidos. Las drogas pueden ser inactivadas, metabolizadas a otros compuestos o al contrario ser cambiadas a componentes bioquímicos activos (20). Por esto es importante corroborar los hallazgos observados in vitro con los obtenidos en un modelo experimental in vivo antes de probar la eficacia terapéutica de las drogas en infecciones causadas por *N. brasiliensis* en humanos. Para ello utilizaremos un modelo de micetoma experimental en ratones BALB/c (16, 17).

El desarrollo de estos estudios nos permitirá proponer nuevos esquemas terapéuticos que sean efectivos y que puedan ser utilizados exitosamente en pacientes. Otro objetivo deseable es que puedan actuar eficazmente en los casos de micetomas resistentes a los antimicrobianos habitualmente empleados, y eviten la amputación del miembro afectado o inclusive la pérdida de la vida.

1.9 Hipótesis

Existen otros antimicrobianos, diferentes a los utilizados en el tratamiento convencional, que son activos tanto in vitro como in vivo contra cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma.

1.10 Objetivos del Trabajo

1.10.1 Objetivo General:

Evaluar la susceptibilidad in vitro e in vivo de *Nocardia brasiliensis* a una serie de antimicrobianos.

1.10.2 Objetivos Particulares:

- 1) Determinar la sensibilidad in vitro de 32 cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de pacientes con micetoma, a diversos antimicrobianos, mediante la técnica de difusión en disco.
- 2) Corroborar los resultados obtenidos en el objetivo uno mediante ensayos de sensibilidad por el método de microdilución en caldo.
- 3) Analizar in vitro el efecto de diversas combinaciones de antimicrobianos sobre las cepas de *Nocardia brasiliensis*.
- 4) Seleccionar los mejores medicamentos o combinaciones y determinar su actividad en un modelo murino de micetoma experimental.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos

Se utilizaron 32 cepas de *Nocardia brasiliensis* aisladas de casos clínicos de micetoma de pacientes del servicio de Dermatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, 6 cepas de *N. asteroides*, 6 cepas tipo, y 3 cepas control, descritas en la tabla I.

Los aislamientos clínicos de *N. brasiliensis* se identificaron mediante pruebas bioquímicas de hidrólisis de caseína, licuefacción de gelatina y descomposición de urea y tirosina. Algunas de ellas se sometieron a análisis de secuenciación de parte del gen para el RNAr 16S, para confirmar su identidad como *N. brasiliensis*.

Como controles externos de los ensayos de susceptibilidad se utilizaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabla I. Actinomicetos utilizados en estudios de difusión en disco.

<i>N.brasiliensis</i> ATCC200358	<i>N.brasiliensis</i> LIID 84	<i>N.asteroides</i> LIIDW-405
<i>N.brasiliensis</i> LIID 1	<i>N.brasiliensis</i> LIID 91	<i>N.asteroides</i> LIIDW-094
<i>N.brasiliensis</i> LIID 5	<i>N.brasiliensis</i> LIIDV-088	<i>N.asteroides</i> LIIDW-115
<i>N.brasiliensis</i> LIID 7	<i>N.brasiliensis</i> LIIDV-158	<i>N.asteroides</i> LIIDW-134
<i>N.brasiliensis</i> LIID 8	<i>N.brasiliensis</i> LIIDV-243	<i>N.asteroides</i> LIIDW-144
<i>N.brasiliensis</i> LIID 13	<i>N.brasiliensis</i> LIIDV-303	<i>N.asteroides</i> LIIDW-146
<i>N.brasiliensis</i> LIID 22	<i>N.brasiliensis</i> LIIDV-321	CEPAS TIPO Y CONTROL
<i>N.brasiliensis</i> LIID 31	<i>N.brasiliensis</i> LIID V-399	<i>N.brasiliensis</i> NCTC103
<i>N.brasiliensis</i> LIID 32	<i>N.brasiliensis</i> LIID X-21	<i>N.asteroides</i> NCTC 6761
<i>N.brasiliensis</i> LIID 33	<i>N.brasiliensis</i> LIID V-409	<i>N.farcinica</i> ATCC3318
<i>N.brasiliensis</i> LIID 38	<i>N.brasiliensis</i> LIIDW-042	<i>N.nova</i> ATCC33726
<i>N.brasiliensis</i> LIID 48	<i>N.brasiliensis</i> LIID W-067	<i>A.maduræ</i> ENBC7550
<i>N.brasiliensis</i> LIID 51	<i>N.brasiliensis</i> LIID W-096	<i>A.maduræ</i> NCTC5654
<i>N.brasiliensis</i> LIID 53	<i>N.brasiliensis</i> LIID W-102	<i>Staph.aureus</i> ATCC25922
<i>N.brasiliensis</i> LIID 54	<i>N.brasiliensis</i> LIID W-120	<i>E. coli</i> ATCC25922
<i>N.brasiliensis</i> LIID 81	<i>N.brasiliensis</i> LIID X104	<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853

2.2 Preparación del inóculo

Las cepas de *Nocardia* se conservaron liofilizadas en ampulas de vidrio, y de ahí se sembraron en agar Saboureaud. Se utilizaron colonias bacterianas de 7 días de crecimiento. De estas colonias se tomaron de dos a tres asadas y se colocaron en un tubo de vidrio estéril de 13 x 100 con 0.1 ml de solución salina. Para preparar una suspensión homogénea del microorganismo, se trituró la masa bacteriana con una varilla de extremo romo durante un minuto. Posteriormente se agregaron 1.5 ml de solución

salina, para resuspender las células bacterianas y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos en una centrífuga marca Eppendorf rotor 5810, para separar los filamentos grandes y masas bacterianas que no fueron suspendidas. El sobrenadante, que contiene principalmente fracciones unicelulares, se ajustó a una concentración equivalente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland.

2.3. Ensayos de susceptibilidad

2.3.1 Ensayo de difusión en disco

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a las directivas del Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, Wayne, PA, USA) para los ensayos de antimicrobianos por difusión en disco para bacterias que crecen aeróbicamente (documento M2-A5).

Se utilizaron placas de 150 mm de diámetro con agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de carnero, que se inocularon con 1 ml de una suspensión de bacterias ajustada a una turbidez equivalente al tubo 0.5 de McFarland y se extendió con un hisopo.

Una vez seca la superficie del agar se colocaron los sensidiscos de los antibióticos y las placas se incubaron a 37°C durante 3 días; al completar este tiempo se determinaron los diámetros de los halos de inhibición.

Para los estudios de difusión en disco se utilizaron en total 44 antimicrobianos pertenecientes a 10 grupos tabla II. Estos se obtuvieron de las siguientes marcas:

Amikacina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ampicilina (10 µg), carbenicilina (100 µg), ceftazidima (30 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxona (30 µg), netilmicina (30 µg), ticarcilina-ácido clavulánico (75-10 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1.25-23.75 µg), eritromicina (15 µg), ciprofloxacina (5µg) y tetraciclina (30 µg). De la marca BBL (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)

Aztreonam (30 µg), cefamandol (30 µg), cefotiam 830 µg), cefpirome (30 µg), cefsulodin (30 µg), ceftiofur (30 µg), enoxacina (10 µg), gentamicina (10µg), isepamicina (30 µg), kanamicina (30 µg), latamoxef (30 µg), mecillinam (10 µg), minociclina (30 µg), nitroxolina (20 µg) , ofloxacina (10 µg), ácido oxolínico (10 µg), pefloxacina (5 µg), ácido pipemídico (20 µg), piperacilina-tazobactam (100-10 µg), pristinamicina (15 µg), espectinomicina (100 µg), espiramicina (100 µg), estreptomycin (10 µg), teicoplanina (30 µg), tobramicina (10 µg), virginiamicina (15 µg),

ticarcilina + ácido clavulánico y nitroxolina (20 µg). De Sanofi Diagnostics Pasteur (Marnes-la-Coquette, France)

Linezolid de Pharmacia Upjohn

Levofloxacin (5 µg) y cefepime (30 µg) de Productos Biológicos de México, S.A. (México, D.F.).

Gatifloxacin, de Bristol Myers y moxifloxacin de Bayer.

2.3.2 Técnica de microdilución en caldo

Las cepas de *Nocardia* fueron analizadas siguiendo los lineamientos del NCCLS para ensayos de antimicrobianos por diluciones (documento M7-A3).

Para este estudio se utilizó caldo Mueller-Hinton adicionado de cationes (calcio y magnesio), con el cual se realizaron diluciones seriadas logarítmicas base 2 de cada antimicrobiano en un rango de concentraciones de 0.125 a 64 µg/ml. Se utilizaron placas de microtitulación (Falcon de Becton Dicknson de Labware) para cultivo de tejidos de 96 pozos de fondo plano con tapa de baja evaporación. En cada pozo de las placas de microtitulación se colocaron 200 µl de los antimicrobianos y se inocularon con 10 µl de una suspensión de cada cepa de *N. brasiliensis* ajustada a una turbidez equivalente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, lo que

resultó en una concentración final de bacterias de 10^4 o 10^5 UFC/ml. Las placas se incubaron a 37°C por 72 horas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), considerada como la primera concentración en orden creciente del antimicrobiano, en la cual no se pudo detectar crecimiento a simple vista. En el caso de las sulfas, debido al efecto de “cola” el CMI se determinó en donde existió 20% de crecimiento bacteriano u 80% de inhibición del mismo.

Los antimicrobianos para estos estudios se obtuvieron de las siguientes marcas:

Amikacina, amoxicilina-AC, gentamicina, netilmicina, espiramicina, sulfametoxazol, tobramicina, carbenicilina, minociclina, y nitroxolina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO).

La isepamicina se obtuvo de la compañía Schering-Plough, gatifloxacina de Bristol-Meyers, moxifloxacina de Bayer y el linezolid de Pharmacia Uphjon.

Para estos ensayos se utilizaron placas con los siguientes antimicrobianos liofilizados obtenidas de Microscan: aztreonam, amoxicilina-AC, ciprofloxacina, gentamicina, ticarcilina-AC., netilmicina, tobramicina, imipenem, y esparfloxacina

2.3.3 Determinación de la sensibilidad de cepas de *N. brasiliensis* a combinaciones de drogas por análisis cruzado.

La combinación de medicamentos ha sido mejor demostrada en la quimioterapia de la tuberculosis, donde la frecuencia de cepas resistentes que aparecían durante la terapia se reducían claramente mediante el uso de antimicrobianos combinados. Ventajas similares se han mostrado últimamente en el uso de terapia combinatoria del tratamiento de infecciones bacterianas. En infecciones causadas por *Nocardia brasiliensis* se ha utilizado con éxito la combinación trimetoprim-sulfametoxazole sola o en combinación con amikacina (39). Es esencial que las combinaciones de antimicrobianos sean evaluadas mediante exámenes de sensibilidad *in vitro* antes de ser aplicadas clínicamente, para determinar si existe un efecto combinatorio de adición, de sinergismo o de antagonismo.

En el presente trabajo, inicialmente se determinaron cuales son los antimicrobianos que tienen mas actividad *in vitro*, y luego ensayamos su actividad en combinación. Para ello se realizó la técnica de combinaciones en tablero de ajedrez (checkerboard). Para ello se utilizaron placas de microtitulación y se colocaron de manera cruzada en columnas que contienen la misma cantidad de una droga que es diluida de forma seriada

base dos en todo el eje x, y en filas que contienen la misma cantidad de la otra droga diluida de forma seriada base dos en el eje y. Por lo tanto cada cuadro (correspondiente a un tubo) en el tablero es una combinación única. En nuestro caso utilizamos concentraciones de 4 a 5 diluciones abajo del CMI y dos diluciones arriba del CMI. En cada pozo de las placas de microtitulación se colocó un volumen total de 210µl formado por 100µl de la droga A, 100µl de la droga B y 10µl de inóculo de bacterias. Una hilera de la placa se tomó como control a la cual no se le colocó ningún antimicrobiano. Las placas se incubaron a 37°C y se leyeron a las 72 hrs.

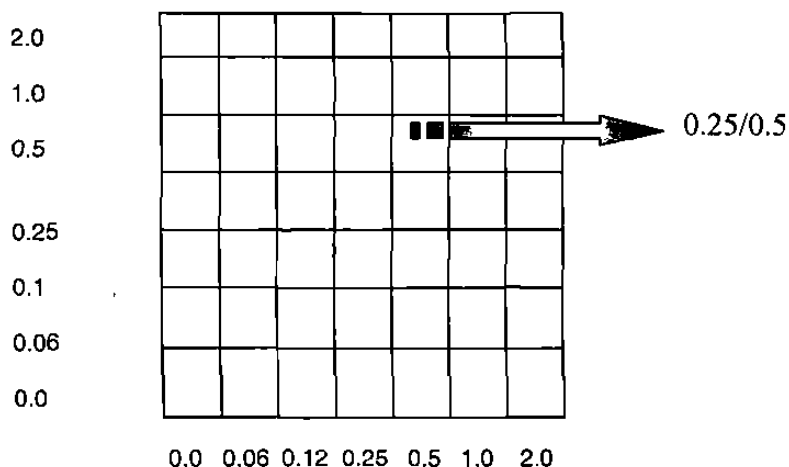


Figura 1.- Arreglo de las diluciones de los antimicrobianos de acuerdo a la técnica en tablero. La flecha indica las concentraciones de cada droga en el tubo correspondiente.

El cálculo del efecto de la combinación de las drogas se valoró de acuerdo al cálculo del índice la concentración inhibitoria fraccional (CIF) cuya fórmula es la siguiente:

$CIF = \text{Droga A} / \text{CMI de esta droga} + \text{Droga B} / \text{CMI de esta droga}$

Esquemáticamente los resultados se valoraron de acuerdo a los patrones A, B, Y C como se indica en la siguiente figura:

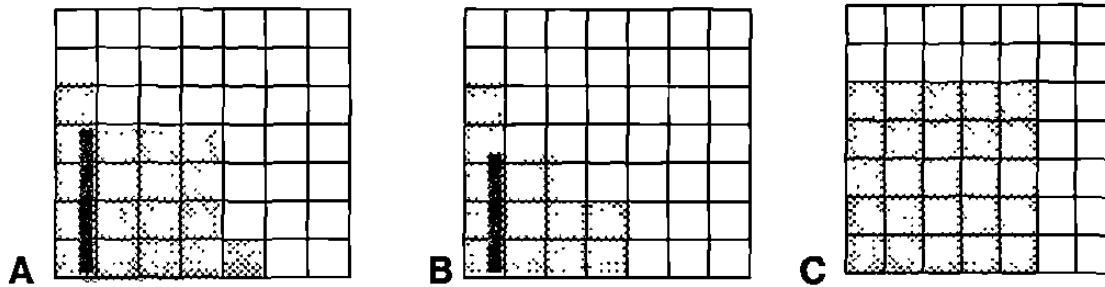


Figura 2 .- Valoración de los efectos de las combinaciones anti-bacterianas de acuerdo al método de tablero. Un crecimiento positivo se representa como cuadro gris. A= Aditivo (indiferente) ; B= Sinérgico y C= Antagonista

2.4 Producción experimental de micetoma en ratones BALB/c.

Para la producción experimental de micetoma en los ratones se siguió el método desarrollado por González-Ochoa y col (17), debido a que con el obtuvimos buenos resultados en el desarrollo de micetoma en el ratón y la reproducibilidad de la técnica (33), (mediante este método se obtienen micetomas en aproximadamente un 70% de los animales a los 40 días de la inoculación). En este estudio se produjeron micetomas experimentales en ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad, mediante la inoculación de 20 mg de peso húmedo de *Nocardia brasiliensis*, de forma subcutánea, en el

cojinete plantar izquierdo. Los ratones se dividieron al azar en cuatro grupos de 15 cada uno y 5 días después de la inoculación se les administraron los antimicrobianos en forma subcutánea a nivel del lomo, a un grupo de 15 animales se les aplicó solución salina como control.

Las dosis del tratamiento se aplicaron cada 12 hrs. por 4 semanas y la lectura de la producción de micetomas se realizó a los 90 días de la inoculación, sin embargo los micetomas se dejaron en observación hasta 150 días para observar si existía involución espontánea.

CAPITULO III

3. RESULTADOS

3.1 Resultados obtenidos en la técnica de difusión en disco.

Los antimicrobianos se dividieron en 10 grupos y su lectura se interpretó en resistente, intermedio ó susceptible de acuerdo a las directivas del Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico (National Committee for Clinical laboratory Standards, NCCLS, Wayne, PA, USA), para los ensayos de antimicrobianos por difusión en disco para bacterias que crecen aeróbicamente (documento M2-A8), tal como se describe en la tabla 2. Para espectinomicina e ísepamicina se tomaron los valores de amikacina, para algunas cefalosporinas en las cuales no existen rangos se tomaron los de la ceftriaxona y de referencia para los macrólidos se tomaron los valores de la minociclina. Tabla II.

Tabla II Grupos de antimicrobianos utilizados en los estudios in vitro por la técnica de difusión en disco, con los valores para su interpretación.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>Antimicrobiano</i>	<i>R</i>	<i>I</i>	<i>S</i>
	<mm rango >mm				<mm rango >mm		
AMINOGLUCÓSIDOS				QUINOLONAS			
Amikacina	14	15-16	17	Levofloxacina	15	16-20	21
Gentamicina	12	13-14	15	Ofloxacina	12	13-15	16
Isepamicina	-	-	17	Ciprofloxacina	15	16-20	21
Netilmicina	12	13-14	15	Enoxacina	14	15-17	18
Tobramicina	12	13-14	15	Perfloxacina	-	-	17
Estreptomycinina	11	12-14	15	Ac. oxolínico	-	-	20
Kanamicina	13	14-17	18	Ac. pípemídico	-	-	20
Espectinomycinina	-	-	17	Gatifloxacina	14	15-17	18
β-LACTÁMICOS				Moxifloxacina	-	-	28
Amoxicilina-AC	13	14-17	18	MACRÓLIDOS			
Ticarcilina-AC	14	15-19	20	Eritromicina	13	14-22	23
Piperacilina-Tz	17	18-20	21	Espiramicina	-	-	23
Ampicilina	13	14-16	17	Pristinamicina	-	-	23
Carbenicilina	19	20-22	23	Virginamicina	-	-	23
Mecillinam	-	-	24	TETRACICLINAS			
CEFALOSPORINAS				Minociclina	14	15-18	19
Cefotaxima	14	15-22	23	Tetraciclina	14	15-18	19
Ceftiofur	-	-	21	SULFONAMIDAS			
Cefepime	14	15-17	18	SMX	10	11-15	16
Cefpirome	-	-	21	CARBAPENEMS			
Ceftriaxona	13	14-20	21	Imipenem	13	14-15	16
Cefamandol	14	15-17	18	Aztreonam	15	16-21	22
Cefotiam	-	-	21	OXAZOLIDINONAS			
Ceftazidima	14	15-17	18	Linezolid	-	-	≥21
Cefsulodin	-	-	21	GLICOPÉPTIDOS			
Latamoxef	-	-	21	Teicoplanina	10	11-13	14

R= resistente, *I*= intermedio, *S*= sensible

En el grupo de los aminoglucósidos se probaron 8 y de ellos 5, presentaron actividad en todas las cepas y los tres restantes, kanamicina, estreptomycinina y espectinomycinina presentaron actividad de 0%, 3% y 10%

respectivamente. Del grupo de β -lactámicos se probaron 6 y presentaron mayor actividad los unidos a inhibidores de betalactamasas, teniendo una actividad del 97% amoxicilina-AC, del 72% ticarcilina-AC y del 45% piperacilina-TZ; del resto carbenicilina 3.4%, ampicilina 0%, mecillinam 0%. Del grupo de las cefalosporinas se probaron 10, de las cuales ninguna tuvo actividad satisfactoria; cefotaxima fue la que presentó mayor actividad en 28% de las cepas probadas y el resto con actividad por debajo del 20%. De las quinolonas se probaron 9, presentando una actividad del 100% gatifloxacina y moxifloxacina ambas fluorquinolonas, seguidas por levofloxacina con actividad en el 48% de las cepas y el resto tuvo actividad en menos del 20% de las cepas probadas. Los macrólidos ensayados fueron 4 y tres presentaron una actividad del 0%, espiramicina presentó un 60% de actividad. Del grupo de los carbapenems, el imipenem presentó 10% de actividad y aztreonam 0%. En el grupo de las tetraciclinas se probó la minociclina con 93% de actividad y tetraciclina con 38%. Del grupo de trimetoprim/sulfametoxazol se obtuvo una actividad en el 83% de las cepas probadas. De las oxazolidinonas se probó el linezolid que tuvo una actividad en el 100% de las cepas, por último de los glicopéptidos, teicoplanina tuvo actividad en el 3% de las cepas probadas. Estos resultados se describen en la tabla III.

Tabla III Resultados del porcentaje de actividad de los antimicrobianos probados, los cuales se dividieron en grupos, los de mayor actividad se encuentran en la primer columna y los de menor actividad en la segunda y tercera. Cada uno, se ensayó en 32 cepas de *N. brasiliensis*, 6 cepas de *N. asteroides*, 6 cepas tipo, y 3 cepas control.

ANTIMICROBIANOS CON MAYOR ACTIVIDAD		ANTIMICROBIANOS CON MENOR ACTIVIDAD			
AMINOGLUCÓSIDOS	%	AMINOGLUCÓSIDOS	%	Latamoxef	10
Amikacina	100	Estreptomicina	3	GLICOPEPTIDOS	%
Gentamicina	100	Kanamicina	0	Teicoplanina	3
Isepamicina	100	Espectinomicina	10	MACRÓLIDOS	%
Netilmicina	100	TETRACICLINAS	%	Pristinamicina	0
Tobramicina	100	Tertracilina	38	Eritromicina	0
OXAZOLIDINONAS	%	β -LACTAMICOS	%	Virginamicina	0
Linezolid	100	Ampicilina	0	CARBAPENEMS	%
QUINOLONAS	%	Carbenicilina	3.4	Imipenem	10
Gatifloxacina	100	Piperacilina/Tazobactam	45	Aztreonam	0
Moxifloxacina	100	Mecillinam	0	QUINOLONAS	%
TETRACICLINAS	%	CEFALOSPORINAS	%	Levofloxacina	48
Minociclina	93	Cefotaxima	28	Ofloxacina	21
β -LACTAMICOS	%	Ceftiofur	21	Ciprofloxacina	17
Amoxicilina-AC	97	Cefpirome	17	Enoxacina	0
Ticarcilina-AC	72	Cefepime	17	Perfloxacina	0
QUINOLINAS	%	Ceftriaxona	10	Acido Oxilínico	0
Nitroxolina	72	Cefamandole	3.4	Acido Pipemídico	0
OTROS	%	Cefotiam	3.4		
SXT	83	Ceftazidima	0		
Espiramicina	66	Cefsulodin	0		

% Representa el porcentaje de cepas sensibles

3.2 Antimicrobianos utilizados en la técnica de microdilución en caldo.

Para realizar los ensayos de sensibilidad por el método de microdilución en caldo, se utilizaron los antimicrobianos que tuvieron mayor actividad por la técnica de difusión en disco, como observamos en la primera columna de la tabla anterior. También se probó la ceftriaxona, antimicrobiano no activo en la técnica de difusión en disco, pero con reportes previos de gran actividad por la técnica de microdilución en caldo con CMI muy bajos en cepas de *Nocardia brasiliensis* por lo que se decidió probarla para observar si su actividad no variaba por la técnica utilizada.

3.3 Resultados obtenidos por la técnica de microdilución en caldo.

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de cada antimicrobiano que corresponden al 100% de ausencia de crecimiento bacteriano de las diferentes cepas. En el caso de SXT se tomó como la concentración mínima inhibitoria aquella que inhibió el 80% del crecimiento bacteriano ya que en este antimicrobiano se presenta un “efecto de cola” en donde no es posible una inhibición del 100%.

Para la interpretación de los resultados, se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias del 50% y 90% de las cepas

estudiadas (32 cepas) para cada uno de los antimicrobianos, para de esta manera determinar la sensibilidad, como se describe en la tabla 4.

Las cepas se clasificaron como susceptibles, intermedios o resistentes de acuerdo a los lineamientos de la NCCLS de microorganismos que crecen aeróbicamente (folletos M7-A4, M2-A5 y M24-A), en estudios de microdilución en caldo.

Observamos que los aminoglucósidos amikacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina e isepamicina, presentaron un 100% de actividad sobre las cepas estudiadas, igual a los resultados que se habían obtenido en los estudios de sensibilidad en disco. El SXT presentó una actividad en el 100% de las cepas estudiadas, es decir más alta que la sensibilidad en disco, donde tuvo una actividad en el 83% de las cepas. El linezolid presentó 100% de actividad en las cepas estudiadas, equivalente a la sensibilidad que presentó en disco, amoxicilina-AC presentó una actividad en el 93.3% de las cepas probadas y en 6.6% resistencia, lo cual concuerda con los resultados de los ensayos de sensibilidad en disco. La nitroxolina es un antimicrobiano que no tiene establecido el CMI aunque se presume que su resultado es muy similar a la sensibilidad que presenta en los resultados en disco. En el grupo de las tetraciclinas, la minociclina presentó actividad en 60% de las cepas, sensibilidad intermedia en 26.6% y resistencia en 13.3%,

esto es más bajo que en los estudios de disco donde tuvo una actividad en el 93% de las cepas, ceftriaxona tuvo actividad en 40% de las cepas probadas y en disco del 10%, por lo que sí fue más alto pero no de importancia, actividad intermedia en 33.33% y resistencia en 26.6%, espiramicina presentó una actividad menor comparada con la técnica de disco, mientras que gatifloxacina y moxifloxacina presentaron una actividad en el 100% de las cepas. Ver tabla IV.

Tabla IV CMI₅₀ y CMI₉₀ por la técnica de microdilución en caldo.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>CMI 50</i>	<i>CMI 90</i>	<i>RANGO</i>
Amikacina	1 µg/ ml	2 µg/ ml	0.125-4 µg/ ml
Gentamicina	1 µg/ ml	2 µg/ ml	0.125 – 2 µg/ ml
Tobramicina	0.5 µg/ ml	2 µg/ ml	0.125 – 4 µg/ ml
Netilmicina	2 µg/ ml	4 µg/ ml	0.25 - 4 µg/ ml
Isepamicina	0.25 µg/ ml	1 µg/ ml	< 0.125 – 4 µg/ ml
TMP/SMX	4.7 / 0.25 µg/ ml	9.5 / 0.5 µg/ ml	1.15 – 62 µg/ ml
Linezolid	1 µg/ ml	2 µg/ ml	0.5 – 4 µg/ ml
Nitroxolina	4 µg/ ml	4 µg/ ml	1 – 16 µg/ ml
Amoxicilina / AC	2 µg/ ml	4 µg/ ml	0.5 – 32 µg/ ml
Minociclina	1 µg/ ml	4 µg/ ml	0.125 – 32 µg/ ml
Ceftriaxona	16 µg/ ml	64 µg/ ml	0.25 - > 64 µg/ ml
Espiramicina	2 µg/ ml	64 µg/ ml	0.25 - > 64 µg/ ml
Gatifloxacina	0.5 µg/ ml	2 µg/ ml	0.25 - 2 µg/ ml
Moxifloxacina	0.5 µg/ ml	2 µg/ ml	0.25 – 2 µg/ ml

CMI₅₀= Concentración mínima inhibitoria del 50% de las cepas estudiadas,
 CMI₉₀= Concentración mínima inhibitoria del 90% de las cepas estudiadas,
 RANGO= Son los valores de las CMI menor y mayor el 100% de las cepas estudiadas.

Los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias de los diferentes antimicrobianos se graficaron contra el porcentaje de cepas inhibidas, para conocer si existía alguna diferencia entre ellos y su relación con amikacina. Se compararon tres grupos: 1.- Los resultados entre las CMI de los aminoglucósidos (figura 3), 2.- La CMI de amikacina contra las CMI de los antimicrobianos de gran actividad pertenecientes a los grupos de oxazolidinonas y fluorquinolonas (figura 4), y 3.- La CMI de amikacina contra las CMI de los grupos de menor actividad estudiados (figura 5).

En la figura No.3 se describen los resultados de los aminoglucósidos que presentaron una actividad en el 100% de las cepas con CMI bajos. Al graficar sus resultados observamos que las curvas de inhibición son muy parecidas, siendo la isepamicina el aminoglucósido con una curva más pronunciada, lo que refleja una mayor actividad que las demás y la netilmicina una curva menos vertical lo cual refleja una actividad de inhibición menor.

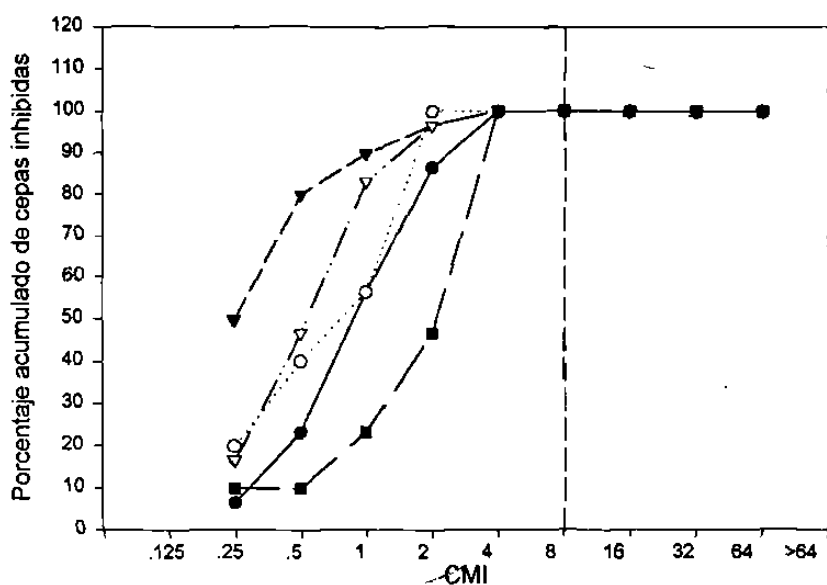


Figura No. 3. Resultados de los CMI contra el porcentaje de cepas inhibidas entre los aminoglucoSIDOS activos. (▲) isepamicina, (Δ) tobramicina, (○) gentamicina, (●) amikacina, (■) netilmicina. La línea punteada es el límite de susceptibilidad para amikacina. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) están en $\mu\text{g/ml}$

En la figura No. 4 al comparar las CMI de la amikacina con los de linezolid, gatifloxacina y moxifloxacina, observamos curvas con pendientes más pronunciadas en estos tres últimos antimicrobianos, siendo muy parecidas entre ellas y la amikacina presenta una pendiente menos vertical, lo cual nos refleja una actividad un poco menor en comparación con estos grupos de antimicrobianos.

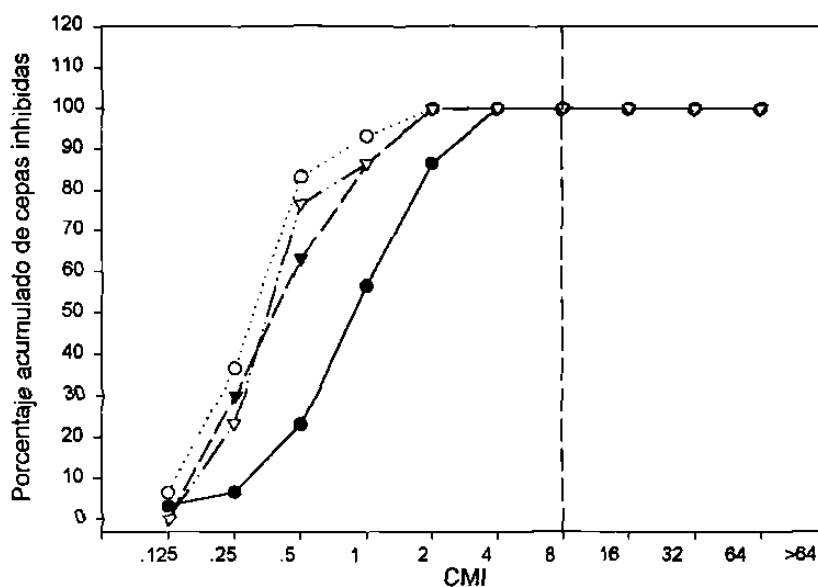


Figura No. 4. Resultados de los CMI contra el porcentaje de cepas inhibidas entre los antimicrobianos nuevos activos y amikacina (○) linezolid, (▲) gatifloxacina, (Δ) moxifloxacina, (●) amikacina. La línea punteada es el límite de susceptibilidad de amikacina. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) están en $\mu\text{g/ml}$

En la figura No. 5 observamos que la amikacina presenta una curva con una pendiente más vertical en relación con el resto de los antimicrobianos por una mayor actividad. La minociclina, amoxicilina/AC y la nitroxolina presentan curvas parecidas a amikacina, y la ceftriaxona si presenta más disparidad ya que su curva es menos pronunciada, lo cual refleja una actividad de inhibición menor.

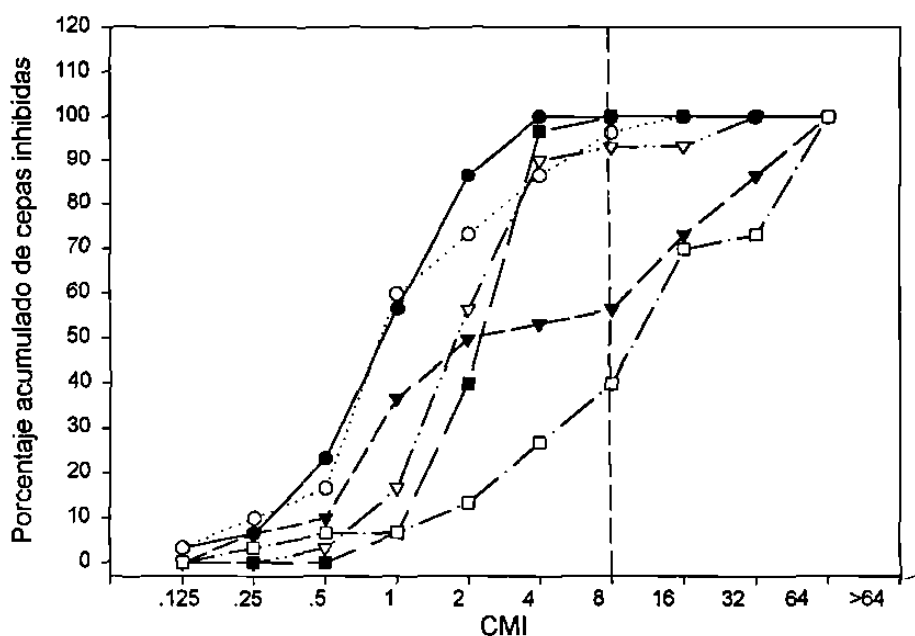


Figura No. 5 Resultados de los CMI contra el porcentaje de cepas inhibidas entre los aminoglucósidos menos activos en comparación con amikacina. (●) amikacina, (○) minociclina, (▲) espiramicina, (Δ) amoxicilina/AC, (■) nitroxolina, (□) ceftriaxona. La línea punteada es el límite de susceptibilidad de amikacina. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) están en $\mu\text{g/ml}$

Al comparar los halos de inhibición contra los valores de CMI de cada uno de los antimicrobianos más activos en las 32 cepas estudiadas, observamos que aunque no existen rangos de susceptibilidad para *Nocardia brasiliensis*, vemos que en 6 de ellos, amikacina, tobramicina, gentamicina, netilmicina, isepamicina y moxifloxacina los rangos de los halos de inhibición se encuentran por arriba de 20 mm por lo que se podría

considerar este valor ó por arriba de él, como parámetro para decidir si una cepa es sensible ó no (Figura 6).

En el caso de SXT, gatifloxacina, nitroxolina, amoxicilina/AC y minociclina los resultados son moderadamente dispersos por lo que no se puede considerar ningún valor de actividad en los ensayos de sensibilidad de disco (Figura 7).

En el caso de ceftriaxona y spiramicina los resultados son muy dispersos que van de $0.25\mu\text{g/ml}$ hasta $> 64\mu\text{g/ml}$ lo cual demuestra y corrobora su inactividad para inhibir el crecimiento de *N. brasiliensis* (Figura 8).

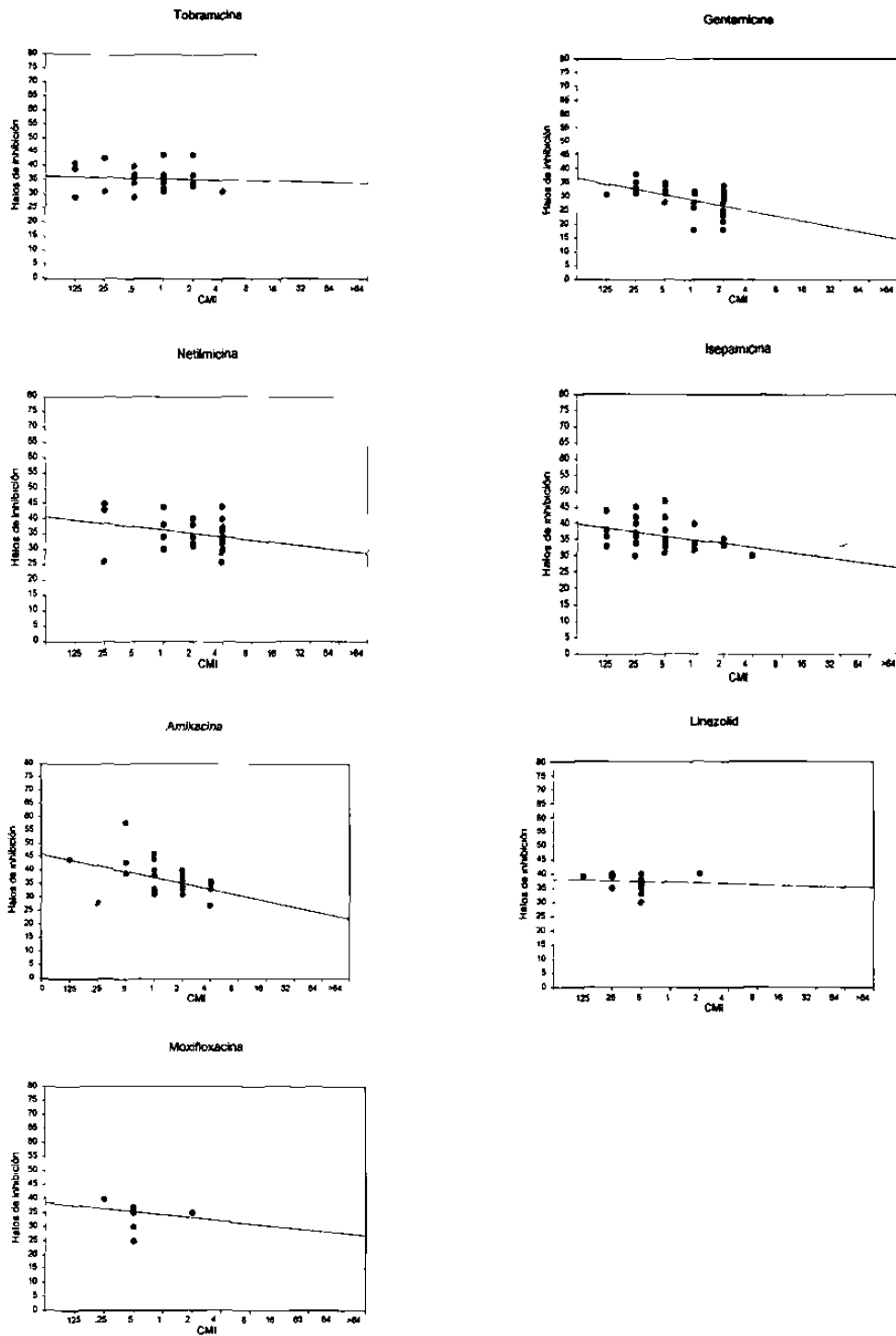


Figura No. 6. Comparación de los halos de inhibición contra los CMI de cada antimicrobiano en 32 cepas en aquellos en donde los halos de inhibición están por arriba de 20 mm. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) están en $\mu\text{g/ml}$

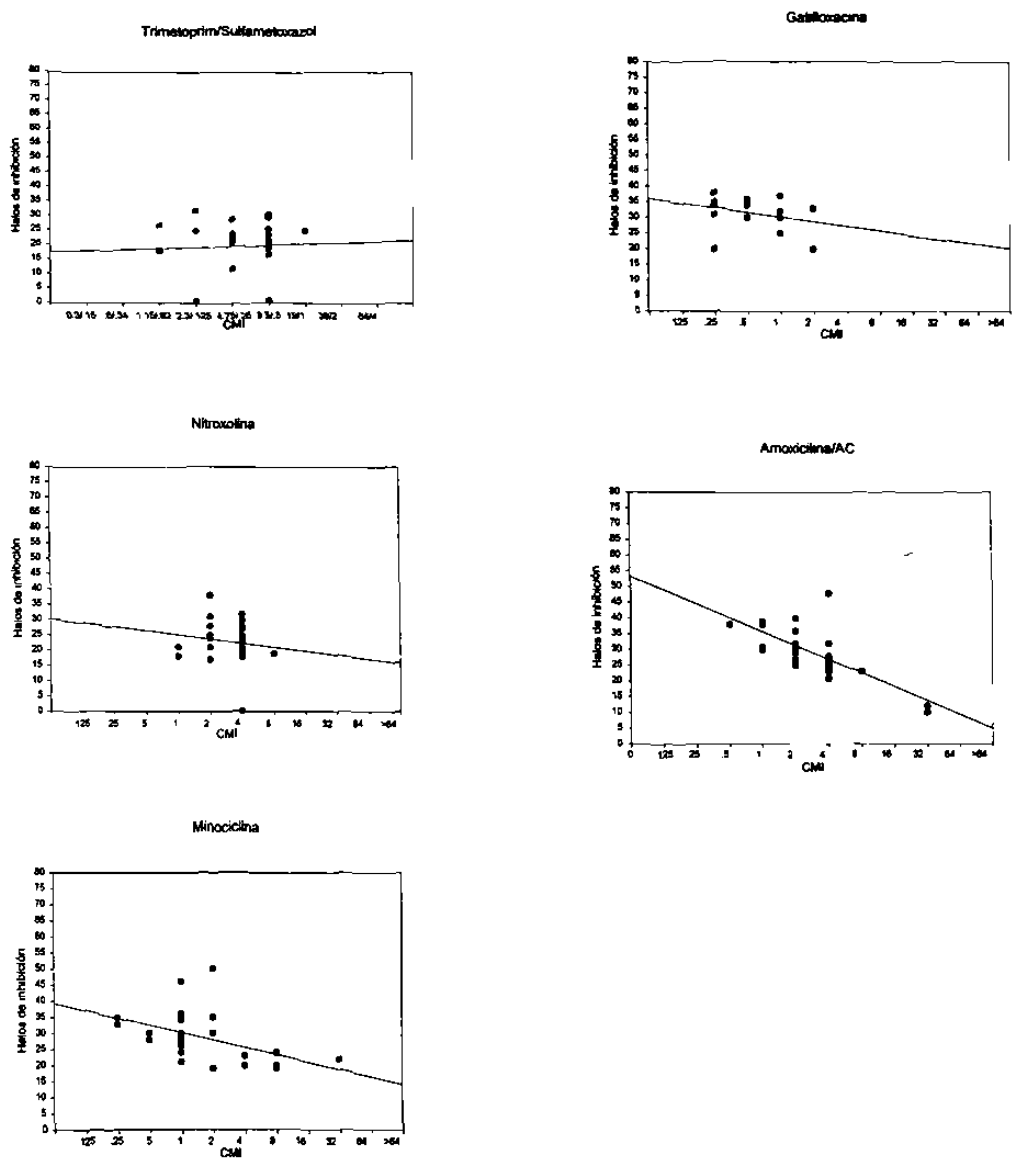


Figura No. 7. Comparación de los halos de inhibición contra los CMI de cada antimicrobiano en 32 cepas en aquellos en donde los resultados son moderadamente dispersos. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) están en $\mu\text{g/ml}$

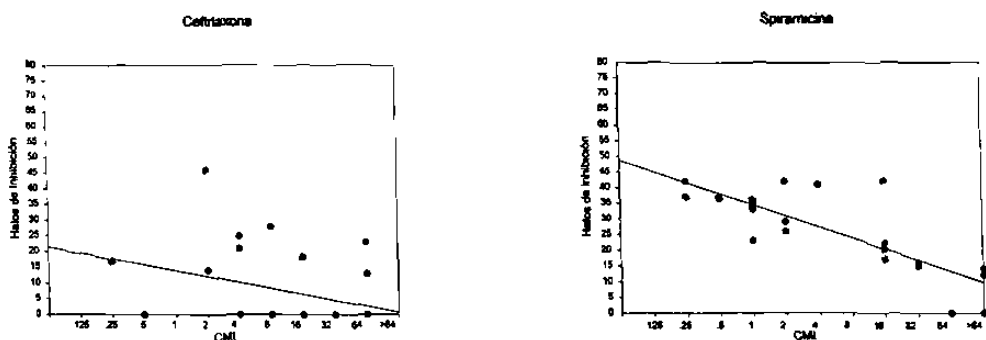


Figura No. 8. Comparación de los halos de inhibición contra los CMI de cada antimicrobiano en 32 cepas en aquellos en donde los resultados son muy dispersos. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) están en $\mu\text{g/ml}$

3.4 Resultados obtenidos de los ensayos de combinación de drogas.

Se realizaron combinaciones de algunos antimicrobianos para conocer el efecto de la combinación de dos drogas activas sobre el CMI comparado con el efecto obtenido individualmente con cada una de ellas, y se clasificó su actividad como: un efecto aditivo, sinérgico ó antagónico.

Se analizaron cuatro combinaciones en 11 cepas, estas fueron:

- 1.- SXT + amikacina esta combinación es la más utilizada en la clínica, 2.- SXT + amoxicilina-AC, 3.- linezolid + SXT y 4.- linezolid + amoxicilina-AC

El cálculo para valorar el efecto de la combinación de las drogas se realizó de acuerdo al cálculo del índice de la concentración inhibitoria fraccional (CIF) cuya fórmula es la siguiente: $\text{CIF} = \text{Droga A} / \text{CMI de}$

esta droga + Droga B / CMI de esta droga, y sus resultados se interpretaron de acuerdo al valor final siguiente: ≤ 0.5 efecto antagónico; $0.5 - 2$ efecto aditivo, ≥ 2 efecto sinérgico.

En los resultados observamos que ningún grupo tuvo efecto antagónico; la combinación con mayor efecto de potencia ó sinergismo fue linezolid + amoxicilina –AC, observándose sinergismo en 9 de las 11 cepas, los grupos de combinación de linezolid + SXT y SXT + amoxicilina-AC presentaron los mismos resultados obteniéndose sinergismo en 7 de las 11 cepas, y en el grupo de SXT + amikacina en 7 de las 11 cepas se encontró un efecto de adición y solo en 4 de 11 se observó un efecto de sinergismo (Tabla V).

Tabla V Resultados obtenidos de la combinación de drogas

<i>ANTIMICROBIANOS</i>	<i>SINÉRGICO</i>	<i>ADITIVO</i>	<i>ANTAGÓNICO</i>
TMP/SMX - AMK	4/11	7/11	0/11
TMP/SMX – AMOXICILINA/ AC	7/11	4/11	0/11
TMP/ SMX – LINEZOLID	7/11	4/11	0/11
LINEZOLID – AMOXICILINA / AC	9/11	2/11	0/11

n= 11

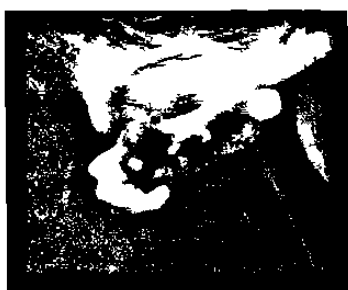
3.5 Producción de micetomas experimentales.

En los estudios in vivo, se produjeron micetomas experimentales en ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad, mediante la inoculación de 20 mg de peso húmedo de *N. brasiliensis* ATCC 200358 de forma subcutánea en el cojinete plantar izquierdo.

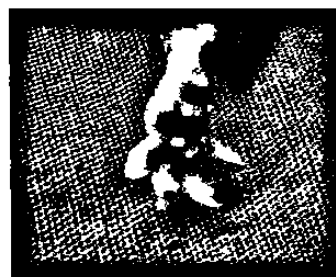
Observamos una inflamación post-inoculación transitoria de una semana aproximadamente de duración, seguido por una etapa desinflamatoria sin datos clínicos de dos semanas de duración. El crecimiento del micetoma comenzó a las tres semanas de la inoculación con un aumento del área de inflamación, al mes y medio comenzó el desarrollo de algunos nódulos, los cuales crecieron de tamaño y en número lentamente hasta la deformación del área infectada, se dejaron evolucionar los micetomas hasta llegar a 150 días para estudiar si no existía regresión espontánea de los mismos, lo cual no se presentó en ningún ratón.

3.6 Resultados obtenidos en los estudios in vivo.

Los resultados in vivo, ver Capítulo 2, se interpretaron a los 90 días post-inoculación, midiendo el desarrollo de los micetomas en cruces como se muestra a continuación.



+



++



+++



++++

Figura 9. Observamos la estadificación de los micetomas en cruces de acuerdo al tamaño de éstos: + micetoma pequeño, ++ micetoma mediano, +++ micetoma grande, ++++ micetoma gigante.

Los ratones se dividieron en 3 grupos de tratamiento con 15 ratones cada uno: amikacina, linezolid y amoxicilina/AC; un grupo control de 15 ratones al cual se le inoculó solución salina como placebo los

antimicrobianos se aplicaron a una dosis de 25 mg/kg y se aplicaron de manera subcutánea en el dorso, iniciando su administración a los 5 días después de la inoculación bacteriana.

Los resultados a los 90 días fueron; en el grupo control de 15 ratones 9 desarrollaron micetomas gigantes de +++++, uno de +++, dos micetomas pequeños y en tres no se desarrollaron micetomas, de los grupos de tratamiento con antimicrobianos, el de la amikacina fue el más débil para inhibir la formación de micetomas, ya que en este grupo se inhibió el crecimiento solo en 5 de 15 ratones, en 5 se desarrollaron micetomas gigantes, en 3 micetomas de +++, y en dos ratones micetomas pequeños de + y ++. Este grupo fue seguido por el grupo de amoxicilina-AC, en el cual en 5 ratones no se presentó formación de micetomas, en 3 se desarrollaron micetomas de +++++, en 2, micetomas de ++, en 2 ratones micetomas de una +, y en tres se desarrolló inflamación sin granulomas. El grupo más efectivo para inhibir la formación de micetomas fue el del linezolid en el que se inhibió la formación de micetomas en 7 ratones, en 2 de los ratones restantes se produjeron micetomas gigantes de +++++, en otros 2 ratones se desarrollaron micetomas pequeños de una + y en 4 solo se desarrolló inflamación sin producirse micetomas. Tabla VI.

Tabla VI Lectura de la producción de micetomas a los 90 días postinoculación en los diferentes grupos de 15 ratones cada uno estudiados.

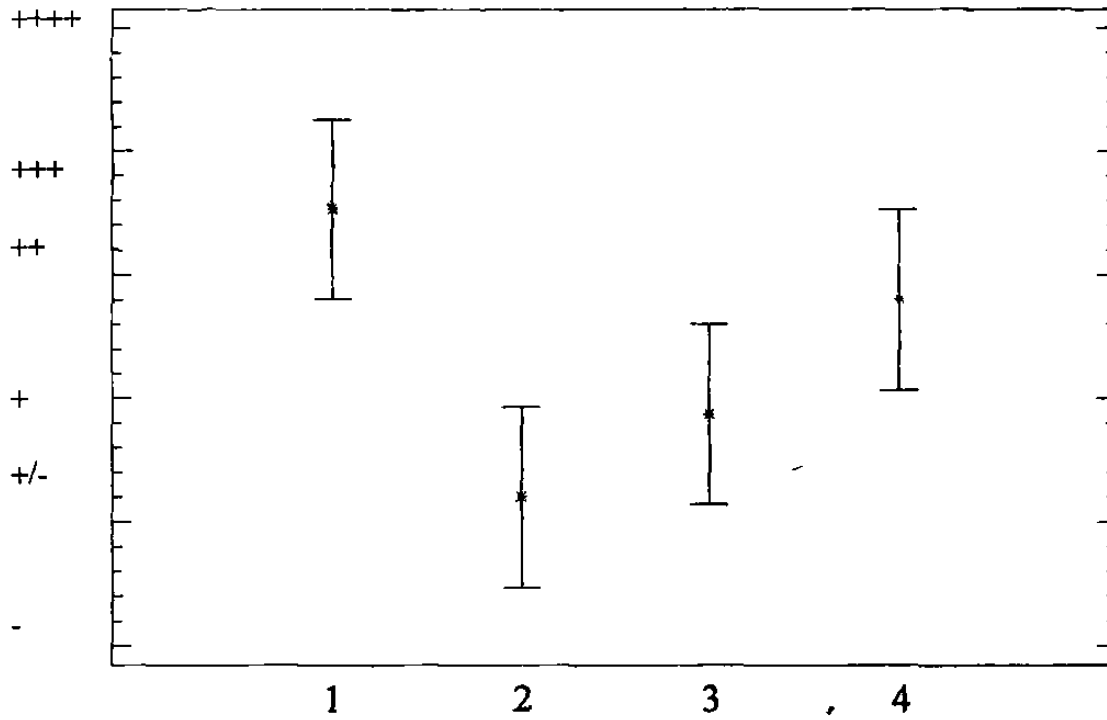
GRADO DE DESARROLLO DE LAS LESIONES	EFECTO DE LOS ANTIMICROBIANOS			
	Sol. Salina	Linezolid	Amoxicilina/AC	Amikacina
No. micetoma	3/15	7/15	5/15	5/15
++++	9/15	2/15	3/15	5/15
+++	1/15	0/15	0/15	3/15
++	0/15	0/15	2/15	1/15
+	0/15	2/15	2/15	1/15
+/-	0/15	4/15	3/15	0/15

Para el análisis estadístico de los estudios in vivo se utilizó la prueba de ANOVA y se observó una diferencia significativa solo con el grupo de linezolid en donde vemos que el límite superior e inferior no se tocan dando una $p < 0.001$ (Tabla VII), (Figura 11).

Tabla VII. En esta prueba de ANOVA se observa una diferencia significativa entre el grupo de solución salina, y el grupo de linezolid, ya que los límites no se tocan.

Grupo	Número de animales	Media	Error estándar	Limite inferior	Limite superior
Solución salina	15	3.53333	0.514396	2.80496	4.26198
Linezolid	15	1.2	0.514396	0.471354	1.92865
Amoxicilina-AC	15	1.86667	0.514396	1.13802	2.59531
Amikacina	15	2.8	0.514396	2.07135	3.52865

Figura 10. Esquemáticamente los resultados de la prueba estadística ANOVA se pueden observar de la siguiente manera.



Grupo 1 Solución Salina, **Grupo 2** linezolid, **Grupo 3** AMX/AC, **Grupo 4** amikacina

DISCUSION

Existen reportes aislados de sensibilidad desarrollados en un número pequeño de cepas de *N. brasiliensis*, aunque no se ha reportado algún estudio in vitro ó in vivo donde se valore la sensibilidad de *N. brasiliensis* a diversos antimicrobianos. El diseño de este estudio consistió en tres fases: la primera fueron estudios de sensibilidad in vitro, la segunda fueron estudios de combinación de antimicrobianos in vitro y la tercera y última fueron los estudios realizados in vivo en ratones.

Los fármacos utilizados se seleccionaron tratando de abarcar la mayor parte de los grupos de antimicrobianos, desde los que se han reportado con y sin actividad sobre *N. brasiliensis* hasta los más nuevos nunca antes probados, con el fin de conocer que grupos de antimicrobianos pueden utilizarse como alternativa efectiva en el tratamiento de los pacientes con micetoma actinomicético.

En el grupo de las sulfas se probó la sensibilidad de *N. brasiliensis* a trimetoprim-sulfametoxazol mediante ensayos de difusión en disco y microdilución en caldo y se obtuvo una sensibilidad del 83% lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (4,16, 40).

150068

Se ha reportado previamente que la amikacina es un aminoglucósido que tiene una gran actividad sobre *N. brasiliensis* y es considerada en muchos casos como el tratamiento de elección (40,45). En nuestro estudio probamos 8 aminoglucósidos por el método de difusión en disco obteniendo en 5 de ellos una respuesta de 100% de actividad (lo que se comprobó posteriormente por el método de microdilución en caldo) estos fueron: la amikacina, la gentamicina, la isepamicina, la netilmicina y la tobramicina. Otros autores han reportado resultados concordantes con los nuestros pero en un menor número de cepas (5, 13, 40). En el caso de la isepamicina, no existen reportes previos, por los resultados de su actividad inhibitoria in vitro debería considerarse como una alternativa terapéutica ya que con ella se reporta una menor incidencia de nefrotoxicidad (21).

Los aminoglucósidos en los que se observó resistencia bacteriana fueron la kanamicina, la estreptomicina y la espectinomicina; esto pudiera deberse a varios mecanismos como son: inactivación de la droga por enzimas bacterianas, por falta de penetración de la droga, ó por baja afinidad de la droga por el ribosoma bacteriano (25). En el caso de la kanamicina, en un estudio realizado en Japón en 1991, se detectó que *N. brasiliensis* y *N. farcinica* tienen una fosfodiesterasa que impide su actividad terapéutica y por lo tanto son resistentes a este antibiótico (54). La

kanamicina tiene en su estructura química un grupo butafenona, a diferencia del resto de los aminoglucósidos, lo que podría también influir en su comportamiento biológico diferente. En cuanto a la estreptomycinina existen estudios in vitro donde se ha reportado su falta de actividad contra *N. brasiliensis* (10) incluso menor que la de la kanamicina. Sin embargo estos estudios han sido realizados en una cantidad pequeña de cepas por lo que se decidió en el presente estudio probarla en una mayor cantidad de cepas de *N. brasiliensis* obtenidas de pacientes de nuestra región obteniéndose los mismos resultados antes mencionados. La falta de actividad in vitro de la estreptomycinina podría también ser consecuencia de la inactivación enzimática por fosforilación. Esto no concuerda con lo publicado por Mahgoub y cols en 1976, en que ellos reportaron 144 casos clínicos de micetomas tratados con estreptomycinina en combinación con trimetoprim-sulfametoxazol, DDS y rifampicina obteniendo un 60% de cura (26). Este efecto podría ser debido a las sulfas y no tanto a la estreptomycinina, por lo que no queda clara su actividad.

Otro grupo importante de antimicrobianos que se probó fue el de los β -lactámicos, de ellos, se estudiaron 8 y presentaron actividades in vitro solo cuando se utilizaron en combinación con inhibidores de β -lactamasas. Anteriormente Wallace y col. reportaron que las bacterias del género

Nocardia producen β -lactamasas. Los genes que codifican para estas enzimas han sido identificados por varios autores y se han encontrado diferentes patrones de β -lactamasas lo que sugiere que los determinantes genéticos de estas enzimas son cromosómicos (32). En el presente estudio, el β -lactámico más potente fue la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (2:1). Los β -lactámicos que no presentaron actividad fueron la ampicilina, la carbencilina, la ticarcilina+ácido clavulánico y el mecilliam lo cual como ya se explicó se debe a la hidrólisis enzimática, producida por las bacterias como se ha reportado previamente (21). Wallace y cols. reportaron en 1983 un estudio in vitro (43) donde 29 cepas de *N. brasiliensis* fueron sensibles a la carbencilina, lo cual no concuerda con nuestros datos. La carbencilina es resistente a una gran cantidad de β -lactamasas conocidas, pero es sensible a otras, y estos resultados podrían deberse a una variación enzimática entre las bacterias de diferentes regiones.

Del grupo de las quinolonas, nosotros estudiamos 9 de ellos y solo en dos que son la gatifloxacina y la moxifloxacina se obtuvo una actividad significativa en las cepas estudiadas. Las fluoroquinolonas son análogos sintéticos del ácido nalidíxico, el cual fue la primer quinolona (1962) utilizada en la clínica. Las modificaciones estructurales del ácido nalidíxico

fueron diseñadas para una mejor resistencia e incremento de su actividad antimicrobiana. El átomo de fluor en la posición 6 aumenta la actividad contra gérmenes grampositivos, y el anillo de piperazina en posición 7 le confiere efecto contra *Pseudomonas spp* (21). Dentro de este grupo de fluoroquinolonas existen una gran cantidad de drogas cuyas características propias se deben a una substitución en la posición 1. La feroxacina fue la primera que mostró actividad contra micobacterias (relacionadas filogenéticamente con *Nocardia*). En 1989 Yazawa reportó una actividad del 100% de una nueva fluoroquinolona, tosufloxacina, contra 111 cepas de *Nocardia* (52). Cada vez aparecen drogas nuevas pertenecientes a este grupo de fluorquinolonas que prometen ser mas potentes, las que se estudiaron en este estudio (gatifloxacina y moxifloxacina) no existen reportes de su actividad sobre bacterias del género de *Nocardia*. Por lo que es muy importante estudiar las drogas más recientes de este grupo ya que podrían ser posibles alternativas terapéuticas.

Del grupo de las tetraciclinas, se probaron la tetraciclina y la minociclina, obteniendo actividad in vitro importante en el 93% de las cepas para la minociclina y poca actividad para la tetraciclina con 38%, lo cual coincide con otros reportes de estudios de sensibilidad in vitro . La diferencia puede deberse a que la minociclina tiene una acción más

prolongada ya que su metabolismo es diferente. En los estudios clínicos reportados anteriormente coinciden con esta efectividad, en micetomas causados por bacterias del género *Nocardia* y *Actinomadura*, su administración es por vía oral pero tiene efectos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad que lo hacen inaccesible para niños menores de 12 años, mujeres embarazadas y pacientes con problemas hepáticos y renales, por lo cual limita su empleo como una buena alternativa de tratamiento (21).

De las drogas con actividad in vitro que no han sido probadas estudiamos la nitroxolina que tuvo un 72% de efectividad. Este es un antimicrobiano perteneciente al grupo de las quinolinas, que in vitro tienen actividad tanto antibacteriana como antifúngica, y en la clínica se utilizan principalmente para infecciones del tracto urinario. Por otro lado se probó la teicoplanina perteneciente al grupo de los glucopéptidos, ésta se relaciona molecularmente con la vancomicina, presentó actividad muy escasa, ya que inhibió el crecimiento de solo el 3% de las bacterias estudiadas.

Del grupo de las cefalosporinas se probaron 10 productos: cefamandole, cefotaxima, ceftiofur, cefpirome, cefepime, ceftriaxona, cefotiam, ceftazidima, cefsulodin y latamoxef de los cuales ninguno presentó actividad contra las 32 cepas de *N. brasiliensis* probadas. Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios previos, donde se

menciona sensibilidad de *N. asteroides*, pero no de *N. brasiliensis* la cual es resistente. Existen algunos reportes de Argentina y EUA de estudios in vitro por CMI en una cantidad no mayor de 12 cepas de *N. brasiliensis* en donde se reporta sensibilidad a la ceftriaxona y a cefotaxima, con un CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ por lo que decidimos calcular el CMI de ceftriaxona para distinguir si probablemente era la técnica utilizada y encontramos resistencia con CMI de 16 a 64 $\mu\text{g/ml}$, y esto podría deberse a la habilidad de las cepas mexicanas regionales de producir β -lactamasas potentes ya que las cefalosporinas que se utilizaron en su mayoría son de tercera y cuarta generación que son resistentes a la mayoría de las β -lactamasas.

En reportes previos se documento sensibilidad a las eritromicina, perteneciente al grupo de los macrólidos. Los nuevos antibióticos de este grupo químico tiene mejor farmacocinética y menores efectos colaterales. En este estudio decidimos probar 4 de ellos 1. eritromicina, 2. pristinamicina, 3. virginiamicina y 4. espiramicina. De ellos eritromicina, pristinamicina y virginiamicina tuvieron 0% de actividad, habría que probar su actividad al combinarla con otras drogas, por otro lado espiramicina tuvo actividad en el 66% de las cepas, este macrólido se utiliza como antiparasitario, no existen reportes previos de su actividad sobre bacterias

del género de *Nocardia*, por lo que sería importante realizar estudios futuros.

Los compuestos de tipo carbapenem son β -lactámicos bicíclicos, con un núcleo común llamado carbapenem. Son resistentes a la hidrólisis enzimática de las β -lactamasas. En este estudio se probaron dos de ellos: el imipenem y el aztreonam y se obtuvo una actividad en el 10% de las cepas de *N. brasiliensis* con el primero y ninguna con el segundo. En lo reportado anteriormente existe mucha controversia con imipenem pero existen reportes de sensibilidad de *N. brasiliensis* a aztreonam (55).

En el presente trabajo se probó otro antimicrobiano de reciente desarrollo, el linezolid, perteneciente al grupo de las oxazolidinonas. Estas sustancias son una nueva clase de antimicrobianos sintéticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas en las etapas tempranas de la traducción (9, 13, 38). El linezolid tiene un amplio espectro incluyendo a *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, micobacterias y microorganismos gram negativos. En nuestro estudio, el linezolid presentó una actividad del 100% en los estudios in vitro, y esto es importante ya que es un antimicrobiano de fácil administración y muy pocos efectos colaterales, aunque cara.

Los actinomicetos son bacterias que están relacionadas filogenéticamente con las micobacterias (*M. tuberculosis* y *M. leprae*) en las que es bien conocido su mecanismo de mutación y resistencia a la monoterapia. En base a esto y tomando en cuenta que en el servicio de Dermatología del Hospital Universitario se observaron pacientes que no mejoraban con los tratamientos tradicionales, desde hace 21 años se inició el tratamiento con politerapia combinando trimetoprim-sulfametoxazol con amikacina, un aminoglucósido, con una respuesta exitosa que fluctúa entre 1 y 3 meses de tratamiento (45) y desde entonces los actinomicetomas resistentes a sulfas, muy extensos ó que comprometían la vida del paciente, se han manejado con esta combinación. Sin embargo se ha observado un caso aislado de resistencia a la amikacina ó bien de pacientes no candidatos, por los efectos colaterales de la amikacina (ototoxicidad ó nefrotoxicidad), lo que motivó el estudio, para obtener otros antimicrobianos y ó combinaciones que puedan ser activas y eficaces en el tratamiento de esta enfermedad.

En los resultados de la evaluación del sinergismo de la combinación de sulfas con otras drogas obtuvimos un mayor efecto al combinarse con amoxicilina- ácido clavulánico y con linezolid obteniendo un efecto sinérgico en 7 de 11 cepas probadas que equivale a un 63.6% de las cepas.

En cambio con la amikacina solo tuvo un efecto sinérgico en 4 cepas de 11 probadas. Esto no concuerda con los resultados terapéuticos observados en donde se obtiene una curación de los pacientes con actinomicetoma en más del 90% ni tampoco con otros estudios in vitro donde se comprueba su efecto potencial; lo cual podría deberse a un efecto de resistencia de las bacterias, o una dosis menor de la empleada con anterioridad.

La combinación con mejor efecto sinérgico fue al combinar linezolid con amoxicilina-ácido clavulánico con lo que se observó un efecto sinérgico en 9 de 11 cepas ensayadas lo cual corresponde al 81.8%.

Con lo anterior concluimos que de los antimicrobianos probados los mas activos son la oxazolidinona, la amoxicilina ácido clavulánico y el trimetoprim-sulfametoxazol.

En los estudios in vivo se seleccionó la amikacina por su bajo efecto nefrotóxico y ser el mas empleado clínicamente, amoxicilina-ácido clavulánico por tener buenos resultados en el tratamiento de pacientes con micetomas, linezolid por los excelentes resultados in vitro y como control solución salina, el tratamiento con sulfas quedó en espera ya que en el intento de utilizarse, los animales sufrieron intoxicación y quemaduras, lo que nos impidió su continuación. En la actualidad no existe algún ensayo in vivo de micetomas por *N. brasiliensis* en el que nos pudiéramos basar.

De los grupos probados, el linezolid tuvo una respuesta que fue estadísticamente significativa, inhibiendo la producción de micetoma en 11 de 15 ratones, los grupos que le siguieron fue el de amoxicilina-ácido clavulánico inhibiendo 8 de 15 y por último la amikacina inhibiendo 5 de 15.

Los resultados obtenidos en los estudios in vivo con la amikacina no se correlacionan con los obtenidos en los ensayos in vitro y en lo observado en el tratamiento de los pacientes, donde es muy efectivo ya que fué el grupo de menor eficacia para evitar la formación de micetomas, esto pudiera explicarse por un metabolismo aumentado del antibiótico con una eliminación más rápida, y con poca concentración a nivel tisular. Se ha visto en estudios previos es que tanto el horario de la administración a los animales, así como la condición de estos y la vía de administración, influye en la biodisponibilidad del medicamento (41), la cual es baja cuando se administra durante la noche ó bien si los animales se encuentran agregados como en este estudio, y es alta si su administración es por vía intramuscular ó parenteral, en nuestro estudio fue de forma subcutánea lo cual es otra variante que pudo haber influido. El grupo al que se administró amoxicilina-AC tuvo un resultado no estadísticamente significativo; pero en los estudios in vitro se demostró su efecto potencial al combinarse con

otras drogas, por lo que sería importante que en estudios futuros se probara en estudios in vivo en combinación con otros antimicrobianos, como las oxazolidinonas. En su utilización clínica se ha reportado una respuesta bastante variable, en nuestra experiencia los pacientes presentan remisión ó mejoría parcial, pero con el tiempo se presentan recaídas, como si la bacteria *Nocardia brasiliensis* desarrollara una resistencia rápida adaptativa al ácido clavulánico resultado de un cambio mutacional que afecta el sitio inhibidor ó activo en la betalactamasa, es deseable estudiar si combinada con otras drogas disminuye esta respuesta de resistencia.

En el año 2003 se reportaron dos ensayos clínicos de pacientes con infecciones por *Nocardia* tratados con linezolid. La nocardiosis, es una infección oportunista causada por bacterias del complejo *N. asteroides* en individuos inmunocomprometidos; el tratamiento es desalentador debido a que las bacterias desarrollan resistencia, con índices de hasta el 50% de letalidad. El primer reporte del tratamiento con linezolid en 5 pacientes con nocardiosis y un paciente por *N. brasiliensis*, reporta un tratamiento exitoso en todos ellos a dosis de 600mg dos veces al día, por tiempo de 2 a 12 meses, sin presentar efectos colaterales importantes (27). Otro reporte de un paciente con nocardiosis tratado con linezolid y minociclina , reporta efectos colaterales importantes por lo que la oxazolidinona se discontinuó a

los 4 meses. Son necesarios más estudios clínicos ya que esta puede ser la droga de elección en estas enfermedades.

De los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos concluir que las sulfas continúan siendo un tratamiento de elección siempre combinándolas con otros antimicrobianos. De los aminoglucósidos los de mayor interés serían amikacina, isepamicina, gentamicina, netilmicina y tobramicina, ya que son los que presentaron mayor actividad, sin embargo los efectos colaterales potenciales y su vía de administración no los hace accesibles a todos los pacientes, pero son una excelente alternativa para el tratamiento combinado. Del grupo β -lactámicos la amoxicilina-ácido clavulánico es el de elección y podría combinarse con sulfas u oxazolidinonas. Las fluoroquinolonas deben estudiarse un poco más en ensayos de combinación de drogas y en estudios in vivo ya que podrían, de confirmarse su efectividad, ser muy buenas alternativas terapéuticas. De las tetraciclinas la minociclina resultó ser un buen candidato para tratamientos combinados.

El linezolid es un antimicrobiano muy potente con efectos colaterales muy bajos y una vía de administración versátil ya que se administra vía oral, intramuscular y parenteral y debería de considerarse como una excelente alternativa para el tratamiento de actinomicetomas. Los grupos de

antimicrobianos no activos contra esta bacteria incluyen a los glucopéptidos, las cefalosporinas, los macrólidos y los carbapenem.

CONCLUSIONES

1. En este estudio observamos que *Nocardia brasiliensis* fue sensible in vitro a varios antimicrobianos, incluyendo: isepamicina, linezolid, moxifloxacina, gatifloxacina, minociclina, amoxicilina/AC.
2. Las combinaciones de antimicrobianos in vitro tuvieron un efecto sinérgico o aditivo, presentando una mayor actividad la combinación de linezolid + amoxicilina/AC, seguido por linezolid + SXT y por último amikacina + SXT.
3. Los resultados de este ensayo in vitro mostraron que el linezolid perteneciente al grupo de las oxazolidinonas, fue el de mayor actividad seguido por la amoxicilina/AC, y por último por amikacina.
4. El linezolid fue activo in vitro e in vivo por lo que es muy importante su estudio en el futuro, ya que podría ser efectivo en el tratamiento de pacientes con actinomicetomas.

BIBLIOGRAFIA :

1. **Bach, M. C., L. D. Sabath, and M. Finland.** 1982. Susceptibility of *Nocardia asteroides* to 45 antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**:554-559.
2. **Beaman, B. L.** 1994. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Rev. Clin. Microbiol.* **7**: 213-264.
3. **Berkey, P., D. Moore, and K. Rolston.** 1988. In vitro susceptibilities of *Nocardia* species to newer antimicrobial agents *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1078-1079.
4. **Biehle J. R., S. J. Cavalieri, M. A. Saubolle, L. J. Getsinger.** 1994. Comparative evaluation of the E test for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 101-110.
5. **Boiron, P., and F. Provost.** 1982. In vitro susceptibility testing of *Nocardia spp.* and its taxonomic implication. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**:623-629.
6. **Brown, B. A., Wallace, R. J., G. Onyi.** 1996. Activities of the glycylicyclines N,N-dimethylglycylamido-minocycline and N-Ndimethylglycylamido-6-demethyl-6-deoxytetracyclin against *Nocardia spp.* and tetracycline-resistant isolates of rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 874-878.
7. **Carter, H. V.** 1874. On mycetoma or the fungus disease of India. J & A Churchill: London
8. **Carter, H. V.** 1860. On a new and striking form of fungus disease principally affecting the foot and prevailing endemically in many parts of India. *Trans. Med. Phys. Soc. Bombay.* **6**: 104-142.
9. **Clemett, D., Markham A.** 2000. "Linezolid". *Drugs.* **59** (4): 815-27.

10. **Chaudhuri, B. N., P. K. Maiti, J. Sil.** 1997. Antibiotic sensitivity patterns of actinomycetes isolated from patients of actinomycetoma. *Indian J. Med. Res.* **105**:162-166.
11. **Diekema, D. I., R. N. Jones.** 2000. "Oxazolidinones: A Review". *Drugs* **59** (1):7-16.
12. **Dixon, J. M.** 1941. Sulfanilamide therapy in madura foot. *Virginia Medical Monthly.* **68**:281-282.
13. **Duran E. L., A. Van Gelderen de Komaid.** 1995. Antimicrobial susceptibilities of regional pathogenic strains of *Nocardia* isolated from mycetomas. *Mycopathologia.* **131**: 167-172.
14. **Folb P.I., A. Timmes and Hanowitz.** 1977. *Nocardia* infections in congenitally athymic (nude) mice and other inbred mouse strains. *Infect. Immun.* **18**: 459-466.
15. **García, M.,** 1950. Sulfonas en el tratamiento del micetoma estudio de un caso. *Prensa Med. Mex.* **15**:262-264
16. **G. F. Carroll., J. M. Brown, and L. D. Haley.** 1977. Method for determining in vitro drug susceptibilities of some *Nocardiae* and *Actinomadurae*. *Am. J. Clin. Pathol.* **68**: 279-283
17. **Godfrey, J.,** 1846. Diseases of the foot not hitherto described. *Lancet.* **1**: 593-594.
18. **González-Ochoa, A., J. Shields, and P. Vásquez.** 1952. Acción de la 4-4 diamidino difenil sulfona frente a *Nocardia brasiliensis*. *Gac. Med. Mex.* **22**:345-354.
19. **González-Ochoa, A.** 1969. Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en el ratón. *Gac. Med. Mex.* **99**:773-781.
20. **González-Ochoa, A.** 1975. Geografía de las micosis profundas. *Rev. Inv. Salud Pub.* **35**: 85-96.
21. **González-Saldaña N., S. P. Saltigeral,** 1997. Antimicrobianos, antivirales, antiparasitos y antimicóticos. 4ta. Edición Mc-Graw-Hill

México.

22. **Kenneth, S.W. and Mahmoud, A.F.** 1984. Tropical and geographical medicine. Ed. Mc Graw-Hill. Pp 934-941.
23. **Latapí, F., P. Lavalle.** 1954. Emploi des sulfones et de l'isoniazide dans le traitement des mycetomes. In: Nem VIII Congr. Bot. Paris 44-47.
24. **López-Martínez, R., L. J. Méndez-Tovar, P. Lavalle, O. Welsh, A. Saul, and E. Macotela-Ruiz.** 1992. Epidemiology of mycetoma in México; study of 2105 cases. Gac. Med. Mex.128:477-481
25. **Mandell, G. L., M. A. Sande.** 1985. Antimicrobial agents, sulfonamides, trimethoprim sulfamethoxazole and agents for urinary tract infection. In: Goodman L. S., Gilman A., eds. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th ed. New York: Mac Millan
26. **Mahgoub, E.S.,** 1976. Medical management of mycetoma. Bull. W. H. O. 54: 303-311.
27. **Moylett, E. H., S. E. Pacheco, B. A. Brown-Elliott, T. R. Perry, E. S. Buescher, M. C. Birmingham, J. J. Schentag, J. F. Gimbel, A. Apodaca, M. A. Schwartz, R. H. Rakita, and R. J. Wallace, Jr.** 2003. Clinical experience with linezolid for the treatment of *Nocardia* infection. Clin. Infect. Dis. 36: 313-318.
28. **Nakae, R., T. Nakae.** 1982. Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 22: 554-559.
29. **Peters, J. T.,** 1945. Clinical cure of madura foot. Am. J. Trop. Med. 25: 363-365.
30. **Pinoy, E.** 1913. Actinomyose et mycétomes. Bull Inst. Pasteur, 11: 929-938.

31. **Rippon, J. W.** 1982. Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3rd ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Co. 79-113.
32. **Sandoval, T.** 1993. Actinomicetos microorganismos de la luz. Ed. Universidad Autónoma Metropolitana 345-432.
33. **Salinas, M. C., L. Vera, O. Welsh, M. Rodríguez.** 1992 Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man. J.Clin. Microbiol. 27:390-397.
34. **Salinas, M. C., S. M. Casillas, O. Welsh.** 1993. Enzyme linked immunosorbent assay for serological diagnosis of *Nocardia brasiliensis* in clinical correlation of mycetoma infections. J. Clin. Microbiol. 31: 2901-2906.
35. **Salinas Carmona, M.C.; Torres López, E; Ramos, A; Licon Trillo, A; Gonzalez Spencer, D.** 1999. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. Infect. and Inmun. 67: 2428-2432.
36. **Saúl, A., A. Gómez, A. Bonifaz, M. López.** 1993. Amoxicillin and cavulanic acid in the treatment for actinomycetoma. Int. J. Dermatol. 3: 218-220.
37. **Serrano, J.A.** 1992. Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos. 1^a Ed. Talleres Gráficos Universitarios. Venezuela.
38. **Vera-Cabrera, L., O. Welsh, M. Rodríguez.** 1991. Desarrollo experimental de micetoma por *Nocardia brasiliensis* en ratones BALB/c. IX Encuentro De Investigación Biomédica, Monterrey.
39. **Vera – Cabrera, L., M. C. Salinas, O. Welsh, M. Rodríguez.** 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. J. Clin. Microbiol. 30: 1183-1188
40. **Wallace, R. J., E. J. Septimus, D. M. Musher, and R. R. Martin.** 1977. Disk diffusion susceptibility testing of *Nocardia* species. J. Infect. Dis. 135: 568-576.

41. **Wallace, R. J., E. J. Septimus, D. M. Musher, and R. R. Martin.** 1979. Treatment of experimental nocardiosis in mice comparison of amikacin and sulfanamide. *J. Infect Dis.* **140**: 244-248.
42. **Wallace, R. J., K. Wiss, R. Curvey, P. H. Vance, and J. Steadham.** 1983 Differences among *Nocardia spp.* in susceptibility to aminoglycosides and *b*-lactam antibiotics and their potential use in taxonomy. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **23**:19-21.
43. **Wallace, R. J., D. R. Nash, W. K. Johnson, L. C. Steele and V. A. Steingrube.** 1987. β -Lactam resistance in *Nocardia brasiliensis* is mediated by β -lactamase and reversed in presence of clavulanic acid. *J. Infect. Dis.* **156**: 959-966.
44. **Welsh, O., López, R.** 1985. Micetomas con diseminación pulmonar. *Med. Cutan. Ibero. Lat. Am.* **13**: 517-523.
45. **Welsh, O., E. Saucedo, J. González, and J. Ocampo.** 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **17**: 443-448.
46. **Welsh, O.** 1991. Mycetoma: Current concepts in treatment. *Int. J. Dermatol.* **30**: 387-398
47. **Welsh, O.** 1993. Treatment of actinomycetoma. *Arch. Med. Research.* **24**: 413-415.
48. **Welsh, O., Salinas, M. C., Rodríguez, M. A.** 1995. Treatment of eumycetoma and actinomycetoma. *Curr. Top. Med. Mycol.* **6**:47-71
49. **Williams, T. Bergey's.** 1989. Manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md. **4**: 2333-2362.
50. **Wherle, W.** 1983. Rifampicina mechanism of action and resistance. *Rev. Infect. Dis.* **3**:407-411.

51. **Worthman, P. D.** 1993. Treatment of a *Nocardia brasiliensis* mycetoma with sulfamethoxazole and trimethoprim-amikacin and amoxicillin and clavulanate. *Arch. Dermatol.* **129**: 564-567.
52. **Yazawa, K., Y. Mikami, J. Uno.** 1989. In vitro susceptibility of *Nocardia spp.* to a new fluoroquinolone, tosufloxacin (T-3262) *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:2140-2141.
53. **Yazawa, K., Y. Mikami, J. Uno, T. Arai.** 1989. In vitro activity of flomoxef, a new oxacephem group antibiotic, against *Nocardia* in comparison with other cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **24**:921-925.
54. **Yazawa, K., Y. Mikami, A. Maeda, T. Kubo, K. Suzuki, N. Saito, A. Kubo.** 1991. Inactivation of kanamycin A by phosphorylation in pathogenic *Nocardia*. *Microbiol. Immunol.* **35**: 39-48.
55. **Yazawa, K., Y. Mikami, S. Ohashi, M. Miyaji, Y. Ichihara, C. Nishimura.** 1992. In-vitro activity of new carbapenem antibiotics: comparative studies with meropenem, L-627 and imipenem against pathogenic *Nocardia spp.* *J. Antimicrob. Chemother.* **29**: 169-172.
56. **Ziprkowski, L., Altmann, G., Dalith, F.** 1957. Mycetoma pedis: four cases treated with streptomycin. *Arch. Dermatol.* **75**: 855-863

PUBLICACIONES

1. **Vera-Cabrera L., A. Gómez Flores, W. Escalante-Fuentes, O. Welsh.** 2001. Study of sensitivity of *Nocardia brasiliensis* strain to several drugs including the novel oxazolidinone PNU-100766. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **17**. S89.
2. **Vera-Cabrera L., A. Gómez Flores, W. Escalante-Fuentes, O. Welsh.** 2001. In vitro activity of PNU-100766 (Linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**. 3629-3630.
3. **Gómez-Flores A., O. Welsh, S. Said-Fernández, G. Lozano-Garza, R.E. Tavares-Alejandro, L. Vera-Cabrera.** 2004. In vitro e in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**. 832-837.

INTERNATIONAL
JOURNAL OF

Antimicrobial Agents

ANTIBACTERIAL
THERAPY

ANTIVIRAL
THERAPY

ANTIPARASITIC
THERAPY

ANTIFUNGAL
THERAPY

IMMUNOTHERAPY

Supplement
Abstracts of the 22nd International
Congress of Chemotherapy, Amsterdam,
The Netherlands, June 30th–July 3rd 2001



The Official Journal of the International Society of Chemotherapy

Methods: Time-kill kinetics were performed under batch culture conditions. Strains of *S. pneumoniae* and *S. aureus* were cultivated in BHI broth # 61617; 50% human serum. The final inoculum was ~ 106 CFU/ml. Multiples (1–32 × MIC) of each antimicrobial's MICs for the test organisms were added to the cultures.

Results: In the absence of serum, Faropenem and amoxicillin were comparably bactericidal against the penicillin-susceptible test strains, while against penicillin-resistant strains, Faropenem exhibited significantly greater bactericidal efficacy throughout the range of test concentrations. In the presence of serum, bactericidal effects of both Faropenem and amoxicillin were reduced, however, the rate of reduction was not significantly different despite the higher protein binding capacity of Faropenem relative to amoxicillin.

Conclusions: Despite the differences between Faropenem and amoxicillin in protein binding, the addition of serum affected the activity of both drugs similarly.

In vitro activity of Faropenem against 384 genetically characterised *Moraxella catarrhalis* isolates and 340 isolates of antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* P19.054

Schmitz FJ, Boos M, Mayer S, Fluit AC. *Institut für Med Mikrobiologie, Dusseldorf, Germany*

Background: Given the increasing prevalence of antibiotic-resistant pathogens, the in vitro activity of Faropenem, a novel broad spectrum antimicrobial, was determined against β -lactamase producing *Moraxella catarrhalis* and multiply antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates.

Methods: Using NCCLS microbroth dilution methodology, the activity of Faropenem was compared with 26 oral and/or parenteral antimicrobial agents against recent European clinical isolates. The following genetically characterised isolates were tested: *M. catarrhalis* ($n = 384$; β -lactamase production: BRO-1, $n = 362$; BRO-2, $n = 22$) and *S. pneumoniae* ($n = 340$; erythromycin- and clindamycin-resistant (ermB-phenotype, $n = 166$), only erythromycin-resistant (mefE-phenotype, $n = 66$), tetracycline-resistant (tetM-phenotype, $n = 290$), levofloxacin (LEV)-resistant (gyrA and parC mutations, combined with efflux activity via pmr, $n = 10$), and trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX)-resistant (sulA mutations, $n = 34$)).

Results: Faropenem exhibited excellent activity is depicted in the table given below.

Conclusions: Faropenem was one of the most potent agents tested, and, therefore, warrants further investigation as a therapeutic option for adult and pediatric respiratory tract infections caused by susceptible pathogens.

In mg/l:	MIC50	MIC90	Range
<i>M. catarrhalis</i>			
BRO-1	0.125	1	0.004–1
BRO-2	0.125	0.25	0.0075–0.5
<i>S. pneumoniae</i>			
ermB-phenotype	0.06	0.25	0.0075–0.5
mefE-phenotype	0.015	0.125	0.004–0.5
tetM-phenotype	0.015	0.25	0.004–0.5
LEV-resistant	0.06	0.25	0.0075–0.5
TMP/SMX-resistant	0.015	0.125	0.004–0.5

P19.054

Strains	FAR	AMX	AMC	CFX	CLA
<i>S. Pneumoniae</i>	1.4×10^{-7} – 4×10^{-6}	1.4×10^{-8} – 1.3×10^{-6}	2×10^{-8} – 7×10^{-5}	1.5×10^{-7} – 6×10^{-6}	7×10^{-8} – 9.3×10^{-4}
<i>M. catarrhalis</i>	1.1×10^{-8} – 8×10^{-6}	3.5×10^{-8} – 1.2×10^{-3}	1.5×10^{-7} – 10^{-5}	3.3×10^{-8} – 1.1×10^{-6}	3.4×10^{-7} – 4.4×10^{-5}

P19.056

Study of the sensitivity of *Nocardia brasiliensis* strains to several drugs, including the novel oxazolidinone PNU-100766 P19.055

Vera-Cabrera LV, Gomez-Flores AG, Escalante-Fuentes WE, Welsh O. *Hospital Universitario, Monterrey, Mexico*

The treatment of mycetoma by *Nocardia brasiliensis* is mainly based on the use of sulfonamides; more recently Welsh et al. have introduced the use of amikacin in severe cases of mycetoma. The treatment in both cases is difficult due to the development of secondary effects produced by the drugs or the development of resistance to the antimicrobials. Given these inconveniences, we have been engaged in studies looking for better alternatives to treat this infection. In order to do so, we determined the sensitivity of 30 *N. brasiliensis* strains to 44 antimicrobials by the disk diffusion method, and corroborate the results with broth microdilution assays. We observed that some antimicrobials have effect over most of the strains, e.g. amikacin, gentamycin, isepamycin, netilmicin, tobramycin, mynociclin, amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, nitroloxin and spyracilin. We also assayed a novel oxazolidinone, the compound PNU 100766. This drug was quiet active against all the *N. brasiliensis* strains tested, with an MIC90 of 2 μ g/ml. We conclude that there exist other drugs, than those used in the conventional treatment, that are active against *N. brasiliensis* and that can be used to treat this infection.

Emergence of resistance in respiratory pathogens against Faropenem in comparison to amoxicillin # 61617; clavulanate, cefuroxime and clarithromycin P19.056

Schubert S, Ullmann U, Dalhoff A. *Klinikum der Christian-Albrechts-University, Strabe, Germany*

Objectives: To compare the spontaneous emergence of resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* against Faropenem to comparator drugs designed for oral therapy of respiratory infections.

Methods: Resistant variants were elicited by spreading an inoculum of 107–108 CFU/ml over BHI agar plates supplemented with 5% bovine blood and test drug: Faropenem (FAR), amoxicillin (AMX), amoxicillin-clavulanate (AMC), cefuroxime (CFX) or clarithromycin (CLA) at 2 × MIC for each test organism [strains of *S. pneumoniae* ($n = 6$) and *M. catarrhalis* ($n = 3$)]. Following overnight incubation at 37 °C, the number of colonies growing on the drug-containing plates was counted. The frequency of resistant variants was calculated as the ratio of resistant variants arising after overnight incubation to the number of CFU originally inoculated.

Results: Exposure of the indicator organisms, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*, resulted the resistance mutation frequencies as shown in the table below.

Conclusions: Overall, the spontaneous emergence of drug resistance against Faropenem was similar to comparator drugs, but for certain strains, comparator drug-induced resistance mutations up to 1000-fold more frequently than Faropenem.

In Vitro Activity of PNU-100766 (Linezolid), a New Oxazolidinone Antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*

LUCIO VERA-CABRERA, ALIANDRA GÓMEZ-FLORES, WENDY G. ESCALANTI-FUENTES,
AND OLIVERIO WELSH*

Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario,
Monterrey, N.L., México

Received 6 November 2000/Returned for modification 3 June 2001/Accepted 14 September 2001

The in vitro activity of a novel oxazolidinone, linezolid, was studied by comparing the activity of linezolid with those of amikacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and amoxicillin-clavulanic acid against 25 strains of *Nocardia brasiliensis* isolated from patients with mycetoma. All *N. brasiliensis* strains tested were sensitive to linezolid (MIC at which 90% of strains are inhibited [MIC₉₀], 2 µg/ml; MIC₅₀, 1 µg/ml). This antimicrobial might constitute a good alternative for treatment of actinomycetoma.

Mycetoma is a localized but progressive infectious disease of the skin, subcutaneous tissues, bone, and adjacent organs that is characterized by firm tumefaction of the affected site, nodules, abscesses, and sinuses that drain pus containing grains or granules (15). This infection is produced by a wide variety of etiologic agents, which can be either bacteria or fungi (15). Worldwide, about 60% of the mycetoma cases are caused by aerobic actinomycetes, but in Mexico, 98% of the cases are caused by bacteria and only 2% are caused by true fungi (6). The infecting microorganisms can be introduced through the skin by minor trauma, such as that inflicted by a thorn or splinter contaminated with soil containing the etiologic agent. The causative agents of mycetoma vary from region to region. In Mexico, 86% of the cases are caused by *Nocardia brasiliensis* and the remainder are caused by *Actinomadura madurae* and other actinomycetes (6). Sulfonamides, particularly sulfamethoxazole combined with trimethoprim (SXT), are the treatment of choice for actinomycetoma (14). One of the disadvantages of this therapeutic scheme is that sulfonamides must be given for several months, even years, and achieve only a 70% cure rate. In 1987, a therapy for disseminated or hard-to-treat cases of actinomycetoma that consisted of amikacin alone or in combination with SXT was described (13). By this therapeutic scheme with this combination of antimicrobials, a higher cure rate was obtained in a shorter period of time than when SXT was used.

In the past 15 years, in our dermatology service, the combination of amikacin and SXT has been the therapy of choice for severe cases of mycetoma or those cases recalcitrant to SXT treatment. However, in isolated cases cure was not always obtained due to the development of resistance to this therapeutic regimen or to the production of secondary effects caused by the amikacin treatment, such as mild ototoxicity or nephrotoxicity, which required the cessation of treatment (14). Therefore, we have considered it necessary to evaluate the in vitro and in vivo activities of other antimicrobials against *N.*

brasiliensis in order to obtain better therapeutic alternatives for the treatment of actinomycetoma.

Linezolid belongs to the oxazolidinone class of synthetic antibacterial agents that act by inhibiting the process of bacterial protein synthesis by a novel mechanism (4, 10). In contrast to other inhibitors of protein synthesis, the oxazolidinones act early in translation by preventing the formation of a functional initiation complex (10). Therefore, the possibilities of observing cross-resistance with other drugs are minimal. This drug has a very wide antimicrobial spectrum including vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* anaerobes, mycobacteria, and other gram-positive microorganisms (1, 2, 3, 5, 8, 9, 16). Since *Nocardia* and *Mycobacterium* are phylogenetically related organisms, it is possible that linezolid is also effective against *Nocardia*. In order to analyze this possibility, we decided to evaluate the in vitro activity of linezolid against 25 clinical isolates of *N. brasiliensis* obtained from patients with actinomycetoma in our dermatological clinic and to compare its antibacterial activity with those of other antimicrobials that have been used for the treatment of this disease, such as SXT, amikacin, and amoxicillin-clavulanic acid.

Linezolid was obtained from its manufacturer (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, Mich.); SXT and amikacin were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), and amoxicillin-clavulanic acid was obtained from commercial sources.

The broth microdilution method that we used has been described before (12). Briefly, we used fresh colonies on Sabouraud agar (7 days old) to prepare the inoculum. Since *N. brasiliensis* grows as a firm mycelial mass (11), we prepared a cellular suspension by placing a couple of loopfuls of the bacterial culture in a glass test tube and ground the bacterial culture to suspend part of the bacterial mass. The ground colonies were suspended in 1 ml of saline solution and were diluted with cation-adjusted Mueller-Hinton broth until the turbidity matched that of a 0.5 McFarland standard. This suspension was diluted to obtain a solution with a final concentration of 1×10^4 to 5×10^4 CFU per well in 0.1 ml. This solution was added to microplate wells (Microtest Primaria; Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.) containing an equal volume of broth with serial dilutions of the drugs to be

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Madero y Gonzalitos, Colonia Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L., México. Phone: (528) 348 03 83. Fax: (528) 348 44 07. E-mail: owelsh@yahoo.com.

TABLE 1. Activities of linezolid and other antimicrobial agents against clinical isolates of *N. brasiliensis*

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a		
	Range	50%	90%
Linezolid	0.5–4.0	1	2
SXT	1.15/0.62–19.1	9.5/0.5	9.5/0.5
Amikacin	0.125–4.0	2	4
Amoxicillin-clavulanic acid	1–32	2	4

^a 50% and 90%, MICs at which 50 and 90% of the *N. brasiliensis* strains are inhibited, respectively.

tested. As a growth control we inoculated in the same way a well containing cation-adjusted Mueller Hinton broth without drug. After 3 days of incubation at 35°C, the plates were read and the MIC was determined as the lowest concentration of drug that totally inhibited nocardial growth. For the sulfonamides, we considered the MIC to be the lowest concentration that inhibited 80% of the growth compared with the amount of growth in the control well. As external controls we used *Escherichia coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213. Linezolid, amikacin, and amoxicillin-clavulanic acid (Augmentin) were tested at concentrations of 64 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$ according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (7). The combination of trimethoprim and sulfamethoxazole (ratio, 1:20) was tested at concentrations ranging from 76/4 to 0.29/0.015 $\mu\text{g/ml}$.

The MICs of linezolid and the other antimicrobial agents tested for the 25 clinical isolates of *N. brasiliensis* tested are summarized in Table 1. Linezolid demonstrated in vitro activity against all isolates tested (MICs, <4 $\mu\text{g/ml}$). The activity of linezolid was comparable to those of SXT and amikacin, which are, to date, the best therapeutic choices for the treatment of actinomycetoma. The combination of amoxicillin-clavulanic acid was active, although the MIC was above 4 $\mu\text{g/ml}$ for 4% of the strains tested.

It appears that the primary activity of linezolid is against gram-positive microorganisms, but it has a broad spectrum of activity, with activity against staphylococci, enterococci, streptococci, and some actinomycetes (1, 2, 8, 9). Our results support the fact that this drug is quite active against all the *N. brasiliensis* isolates tested. Although we have evaluated other drugs in vitro, they have not been as active as linezolid against all the strains tested (data not shown). On the other hand, linezolid had homogeneous antibacterial activity against 100%

of the *N. brasiliensis* isolates tested. Given the in vitro results described here, linezolid could be an excellent drug for the treatment of patients with actinomycetoma.

We acknowledge the support of the National Council for Science and Technology (CONACYT) (grant 31015-M).

We thank R. M. Chandler-Burns for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Bowersock, T. L., S. H. Salmon, E. S. Portis, J. F. Prescott, D. A. Robison, C. W. Ford, and J. L. Watts. 2000. MICs of oxazolidinones for *Rhodococcus equi* strains isolated from human and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1367–1369.
- Clemett, D., and A. Markham. 2000. Linezolid. *Drug* 59:815–827.
- Cynammon, M. H., S. P. Klemens, C. A. Sharpe, and S. Chase. 1999. Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1189–1191.
- Diekema, D. L., and R. N. Jones. 2000. Oxazolidinones: a review. *Drugs* 59:7–16.
- Hamel, J. C., D. Stapert, J. K. Moerman, and C. W. Ford. 2000. Linezolid, critical characteristics. *Infection* 28:60–64.
- López-Martínez, R., L. J. Méndez-Tovar, P. Lavalle, O. Welsh, A. Saul, and E. Macotela-Ruiz. 1992. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gac. Med. Mex.* 128:477–481.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard. Document M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Noskin, G. A., F. Siddiqui, V. Stosor, D. Hacek, and L. R. Peterson. 1999. In vitro activities of linezolid against important gram positive bacterial pathogens including vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2059–2062.
- Rybak, M. J., D. M. Cappellety, T. Moldovan, J. R. Aeschlimann, and G. W. Kaatz. 1998. Comparative in vitro activities and post-antibiotic effects of the oxazolidinone compounds eperozolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:721–724.
- Shinabarger, D. L., K. R. Marotti, R. W. Murray, A. H. Iln, E. P. Melchior, S. M. Swancy, D. S. Donyak, W. F. Demyan, and J. M. Buysse. 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperozolid on translation reactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2132–2136.
- Vera-Cabrera, L., M. A. Rodríguez-Quintanilla, P. Boiron, M. C. Salinas-Carmona, and O. Welsh. 1998. Experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J. Mycol. Med.* 8:183–187.
- Wallace, R. J., Jr., and L. C. Steele. 1988. Susceptibility testing of *Nocardia* species for the clinical laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 9:155–166.
- Welsh, O., E. Saucedo, J. González, and J. Ocampo. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:443–448.
- Welsh, O. 1991. Mycetoma. Current concepts in treatment. *Int. J. Dermatol.* 30:387–398.
- Welsh, O., M. C. Salinas, and M. A. Rodríguez. 1994. Mycetoma: p. 1402–1406. In P. D. Hoepflich, M. C. Jordan, and A. R. Ronald (ed.), *Infectious diseases*, 5th ed. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa.
- Zurenko, G. E., B. H. Yagi, R. D. Schaadt, J. W. Allison, J. O. Kilburn, S. E. Glickman, D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, and S. J. Brickner. 1996. In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:839–845.

In Vitro and In Vivo Activities of Antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*

Alejandra Gomez-Flores,¹ Oliverio Welsh,¹ Salvador Said-Fernández,² Gerardo Lozano-Garza,²
Roman Erick Tavaréz-Alejandro,¹ and Lucio Vera-Cabrera^{1*}

Servicio de Dermatología, Hospital Universitario "José E. González,"¹ and Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS,² Monterrey, N.L., México

Received 4 August 2003/Returned for modification 14 October 2003/Accepted 11 November 2003

In Mexico mycetomas are mostly produced by *Nocardia brasiliensis*, which can be isolated from about 86% of cases. In the present work, we determined the sensitivities of 30 *N. brasiliensis* strains isolated from patients with mycetoma to several groups of antimicrobials. As a first screening step we carried out disk diffusion assays with 44 antimicrobials, including aminoglycosides, cephalosporins, penicillins, quinolones, macrolides, and some others. In these assays we observed that some antimicrobials have an effect on more than 66% of the strains: linezolid, amikacin, gentamicin, isepamicin, netilmicin, tobramycin, minocycline, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, nitroxolin, and spiramycin. Drug activity was confirmed quantitatively by the broth microdilution method. Amoxicillin-clavulanic acid, linezolid, and amikacin, which have been used to treat patients, were tested in an experimental model of mycetoma in BALB/c mice in order to validate the in vitro results. Linezolid showed the highest activity in vivo, followed by the combination amoxicillin-clavulanic acid and amikacin.

Mycetoma is an important cause of dermatological consultation in many tropical and subtropical countries (17). Therapy for mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis* has traditionally been based on the use of sulfonamides, such as dapsone, DDS, sulfamethoxy-pyridazine, and sulfadoxine (10, 11, 15, 16, 37). Streptomycin in combination with dapsone or trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) has also been used to treat patients with actinomycetomas, particularly those cases produced by *Streptomyces somaliensis* (19), with a cure rate of about 63.2%. More recently, the use of SXT for the treatment of actinomycetoma has been reported (18, 25, 36). In our dermatology clinic we have used the combination amikacin-SXT to treat severe cases of mycetoma or those cases involving subjacent organs and have obtained a cure rate of about 95% (36; O. Welsh, and L. Vera-Cabrera, Abstr. 15th Cong. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol., abstr. 354, 2003). However, in many cases the use of these drugs may run the risk of development of bacterial resistance or side effects (21, 37); therefore, it is important to assay other drugs in order to select more potent, less toxic antimicrobials.

Considering this background, we have begun to evaluate in vitro and with an experimental murine model the activities of alternative antimicrobials for the treatment of actinomycetoma caused by *N. brasiliensis*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. In this work, we used 30 strains of *N. brasiliensis* isolated from patients with mycetoma referred to our clinical dermatology department. Since a subtaxon of *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis*, has recently been described, we took care to include only *N. brasiliensis* sensu stricto strains in this

study. The strains were identified by conventional biochemical tests (22), and their identities were confirmed by DNA sequencing of a region located between nucleotides 70 and 334 of the *N. brasiliensis* 16S RNA gene (GenBank accession number Z36935). This fragment was amplified with primers NOC-3 (5'-ACG GGT GAG TAA CAC GTG-3') and NOC-4 (5'-AGT CTG GGC CGT GTT TCA GTC-3'), which are specific for sequences located in conserved areas, although DNA sequencing of some internal regions allowed us to differentiate most of the *Nocardia* species.

The strains were grown on Sabouraud dextrose agar for 7 to 10 days, and a suspension of each strain was made in 20% skim milk. These bacterial suspensions constituted our stock cultures, which were kept at -70°C in cryovials until use.

Disk diffusion method. The *N. brasiliensis* strains were grown on Sabouraud agar for 7 days at 30°C, and several colony fragments were transferred to a sterile test tube. The bacterial mass was ground with a glass stick, and approximately 2 ml of saline solution was then added. The suspension was centrifuged at 100 × g for 10 min; and the turbidity of the supernatant, which mainly contained short fragments and nocardial cells, was adjusted to that of the 0.5 McFarland standard. One milliliter of this suspension was added to a 150-mm petri dish with Mueller-Hinton agar supplemented with 5% blood agar. After the plate surface was dry, paper disks containing the antimicrobials were placed on it, and the plates were incubated at 37°C for 3 days. The inhibition zone diameters were measured at the end of this incubation period. Fine growth or haze was ignored when the readings were made. The interpretation was based on the NCCLS guidelines for gram-positive organisms, since there are no approved NCCLS guidelines for *Nocardia*. The following antimicrobials were used in this study: amikacin (30 µg), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin (10 µg), carbenicillin (100 µg), ceftazidime (30 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxone (30 µg), netilmicin (30 µg), ticarcillin-clavulanate (75/10 µg), SXT (1.25/23.75 µg), erythromycin (15 µg), ciprofloxacin (5 µg), and tetracycline (30 µg) were purchased from Becton Dickinson (Cockeysville, Md.). Aztreonam (30 µg), cefamandole (30 µg), cefotiam (30 µg), cefpirome (30 µg), cefsulodin (30 µg), cefixime (30 µg), enoxacin (10 µg), gentamicin (10 µg), isepamicin (30 µg), kanamycin (30 µg), moxalactam (30 µg), amdinocillin (10 µg), minocycline (30 µg), nitroxolin (20 µg), ofloxacin (10 µg), oxolinic acid (10 µg), pefloxacin (5 µg), piperacillin-tazobactam (100/10 µg), pristinamycin (15 µg), spectinomycin (100 µg), spiramycin (100 µg), streptomycin (10 µg), teicoplanin (30 µg), tobramycin (10 µg), and virginiamycin (15 µg) were obtained from Sanofi Diagnostics Pasteur (Marnes-la-Coquette, France). Levofloxacin (5 µg) and ceftazidime (30 µg) disks were obtained from Productos Biológicos de México, S.A. (Mexico City, Mexico). Linezolid was kindly donated by Pharmacia

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, U.A.N.L., Madero y Gonzalitos, Colonia Miras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L., Mexico. Phone: 5281 8348 0383. Fax: 5281 8348 44 07. E-mail: luvera_99@yahoo.com.

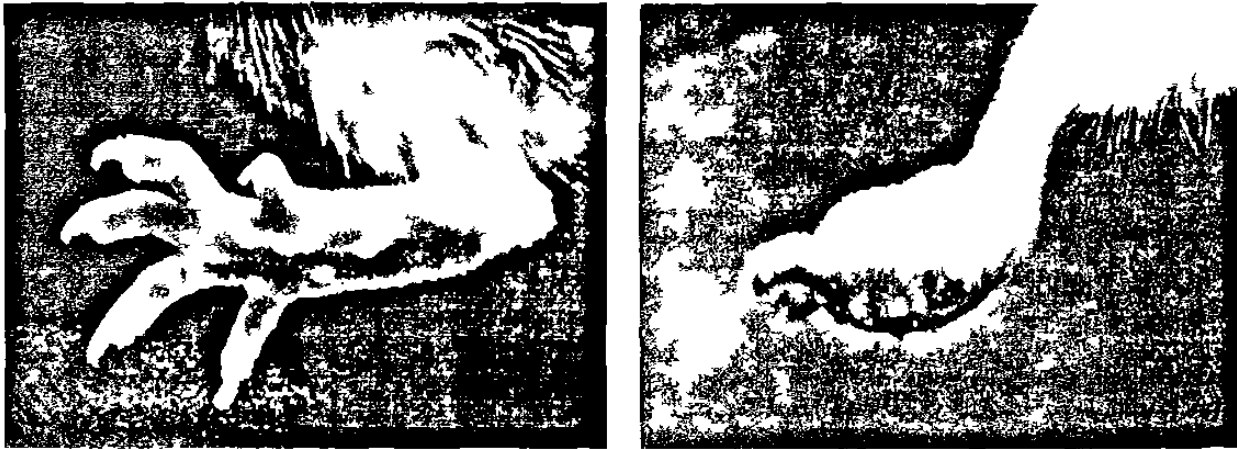


FIG. 1. Production of mycetoma lesions in infected BALB/c mice after 90 days of inoculation. Left photo, a mouse with no lesions; right photo, a mouse with a 4+ lesion.

Upjohn (Kalamazoo, Mich.), and disks containing 30 μg of the drug were prepared in-house.

Broth microdilution method. Amikacin, amoxicillin, gentamicin, netilmicin, spiramycin, trimethoprim, sulfamethoxazole, tobramycin, carbenicillin, minocycline, and nitroxolin were purchased from Sigma Chemical Products (St. Louis, Mo.). Isepamicin was obtained from Schering-Plough (Mexico City, Mexico). Premade amoxicillin-clavulanic acid (2:1; Augmentin) plates for MIC determinations were obtained from Dade Microscan (West Sacramento, Calif.). The linezolid MICs for the *N. brasiliensis* isolates included in this study have been reported elsewhere and therefore were not determined in the present work (30).

The broth microdilution method that we used has been described before (6, 7, 30). Briefly, we used fresh colonies on Sabouraud agar (7 days old) to prepare the inoculum. The bacterial suspension was diluted to obtain a solution with a final concentration of 1×10^4 to 5×10^4 CFU per well in 0.1 ml. This solution was added to microplate wells (Microtest Primaria; Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, N.J.) containing an equal volume of broth and serial dilutions of the drugs to be tested. As a growth control we inoculated in the same way a well containing cation-adjusted Mueller-Hinton broth without drug. After 3 days of incubation at 35°C, the plates were read and the MIC was determined as the lowest concentration of drug that totally inhibited nocardial growth. For the sulfonamides we considered the MIC to be the lowest concentration that inhibited 80% of the growth compared with the growth in the control well. We used *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 as external controls. All the antimicrobials except SXT were tested at concentrations of 0.25 to 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The combination of trimethoprim and sulfamethoxazole (which were used at a ratio of 1:20) was tested at concentrations ranging from 0.3/0.015 to 152/8 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Combination assays. We used a previously described (8) checkerboard method to determine the effects of the combinations of two drugs on *N. brasiliensis*. Briefly, the drugs to be tested were diluted twofold from column 1 to column 10 of each microplate well. Twofold dilutions of drug B were then added to rows 1 to 8 and the wells were inoculated with 10 μl of the inoculum (1×10^4 to 5×10^4 CFU per well). The plates were incubated at 35°C for 3 days. In order to better visualize the presence of growth, Alamar blue was added to the plates. The fractional inhibitory concentrations of each combination were then calculated.

Experimental therapy for mycetoma caused by *N. brasiliensis* in BALB/c mice. Experimental mycetoma was produced by injecting 20 mg (wet weight) of a *N. brasiliensis* suspension into the left hind footpad of female BALB/c mice (age, 6 to 8 weeks) (12). The mice were divided into groups of 15 animals each, and 1 week later, the drugs were administered subcutaneously at a dose of 25 mg/kg of body weight twice a day for 4 weeks. A control group of animals was inoculated with saline solution.

Ninety days after inoculation the mycetoma lesions were scored from 0 to 4+, depending on the level of development of the mycetoma lesions, from the presence of minimal or no inflammation to the extensive formation of abscesses, respectively (Fig. 1).

Statistical analysis. The analysis of variance (ANOVA) test was applied to determine significant differences among the experimental groups.

RESULTS

Disk diffusion method. A total of 44 antimicrobials belonging to different chemical groups were tested (Table 1). All aminoglycosides with the exception of kanamycin and streptomycin were active against 100% of the strains; kanamycin and streptomycin were active against less than 5% of the strains. Minocycline was also very active (93%), while tetracycline showed a low level of activity (38%). Beta-lactams did not show good activities against the *N. brasiliensis* strains unless they were combined with beta-lactamase inhibitors, in which case a significant increase in activity was observed, particularly when the combination of amoxicillin and clavulanic acid was used. As expected, SXT was active against most of the strains. Two other compounds, nitroxolin and spiramycin, were active against more than 60% of the strains. Antimicrobials in the cephalosporin, macrolide, carbapenem, and quinolone groups had no activity or only low levels of activity against the *N. brasiliensis* strains tested.

Linezolid is known to be highly active against *N. brasiliensis* (7, 30). We included this drug in the disk diffusion assays because the inhibition zone diameters achieved with this drug have not yet been reported. All the strains tested were sensitive to linezolid (MIC at which 90% of strains tested are inhibited [MIC₉₀], 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; MIC₅₀, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (30) and showed large inhibition zone diameters (range, 30 to 42 mm; mean \pm standard deviation, 37 mm).

Broth microdilution method. Antimicrobials with activities against more than 60% of the strains tested were assayed by the broth microdilution method (Table 2). The MICs of amikacin, gentamicin, amoxicillin-clavulanic acid, and SXT were under the breakpoints established for *Nocardia* spp. for all the *N. brasiliensis* strains tested (6, 24). Although the breakpoints for isepamicin and netilmicin for *Nocardia* have not yet been established, the MICs of the two drugs for the *N. brasiliensis* strains were under the breakpoint for amikacin and the strains

TABLE 1. Susceptibilities of the *N. brasiliensis* strains to several antimicrobials determined by disk diffusion assays

Antimicrobial	% Susceptible
More active drugs	
Aminoglycosides	
Amikacin	100
Gentamicin	100
Isepamicin	100
Netilmicin	100
Tobramycin	100
Tetracyclines (minocycline)	93
Beta-lactams	
Amoxicillin-clavulanate	97
Piperacillin-tazobactam	72
Ticarcillin-Clavulanate	45
Quinolins (nitroxolin)	72
Sulfonamides (SXT)	83
Oxazolidinones (linezolid)	100
Less active drugs	
Aminoglycosides ²	
Streptomycin	3
Kanamycin	0
Aminocyclitols (spectinomycin)	10
Penicillins	
Ampicillin	0
Carbenicillin	3.4
Mecillinam	0
Cephalosporins	
Cefotaxim	28
Ceftiofur	21
Cefpirome	17
Cefepime	17
Ceftriaxone	10
Cefamandole	3.4
Cefotiam	3.4
Ceftazidime	0
Cefsulodin	0
Latamoxef	10
Glycopeptides (teicoplanin)	3
Macrolides	
Spiramycin	66
Erythromycin	0
Carbapenems	
Imipenem	10
Aztreonam	0
Quinolones	
Levofloxacin	48
Ofloxacin	21
Ciprofloxacin	17
Enoxacin	0
Pefloxacin	0
Streptogramins	
Virginiamycin	0
Pristinamycin	0

TABLE 2. Activities of antimicrobial agents against clinical isolates of *N. brasiliensis* determined by the broth microdilution method

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Range	50%	90%
Amikacin	0.125-4	2	4
Amoxicillin-clavulanic acid	1-32	2	4
Ceftriaxone	0.25-64	16	64
Gentamicin	0.125-2	1	2
Isepamicin	0.125-4	0.25	1
Minocycline	0.125-32	1	8
Netilmicin	0.25-4	4	4
Nitroxolin	1-16	4	4
Spiramycin	0.25-64	2	64
SXT	1.15/0.62	9.5/0.5	9.5/0.5

can probably be considered sensitive to the two drugs. Nitroxolin and spiramycin also showed good activities against the clinical isolates.

In our study most of the strains were resistant to ceftriaxone in the disk diffusion assays; however, since other investigators have published data supporting the sensitivity of *N. brasiliensis* to this cephalosporin (6, 7, 33), we included this drug in the broth microdilution assays. The cumulative MICs of amoxicillin-clavulanic acid, amikacin, and ceftriaxone for the *N. brasiliensis* isolates are presented in Fig. 2. When a breakpoint of 8 $\mu\text{g/ml}$ for the three antimicrobials was considered (24), ceftriaxone was the least active of the three, with less than 50% of the strains being intermediate or resistant to this drug.

Assays with drug combinations. Given that combination therapy seems to work better for actinomycetoma, we selected amikacin, SXT, amoxicillin-clavulanic acid, and linezolid to determine the effects of combinations of these drugs on *N. brasiliensis*. Table 3 shows that some of the combinations tested, particularly amoxicillin-clavulanic acid in combination with linezolid, had synergistic activities. None of the combinations had a remarkable synergistic effect against the clinical isolates.

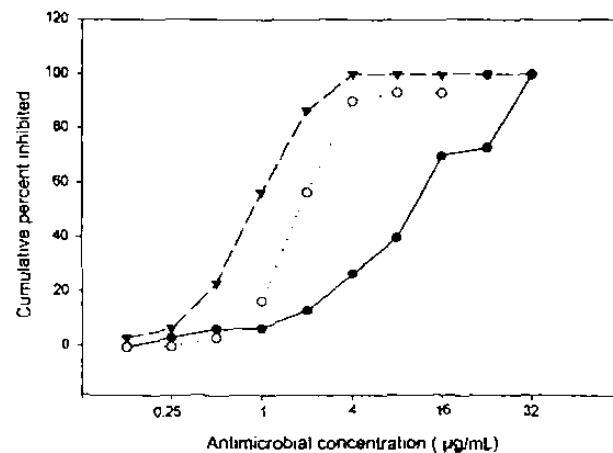


FIG. 2. Sensitivity of *N. brasiliensis* to amikacin (\blacktriangledown), amoxicillin-clavulanic acid (\circ), and ceftriaxone (\bullet). The graph shows the cumulative MICs of each drug for the strains. The breakpoints for these three drugs are represented by a dotted vertical line.

TABLE 3. Effects of combinations of several drugs on the MICs for *N. brasiliensis* isolates^a

Antimicrobial combination	No. of animals in which the drug combination had the following effect		
	Synergistic	Additive	Antagonistic
Amikacin-SXT	4	7	0
Amoxicillin-clavulanic acid-SXT	7	4	0
Linezolid-SXT	7	4	0
Linezolid-amoxicillin-clavulanic acid	9	2	0

^a A total of 11 mice were tested.

Effects of the drugs on the natural course of *N. brasiliensis* mycetoma in BALB/c mice. By the methodology used to infect the animals, mycetoma lesions appeared as early as 1 month after the initial inoculation. We monitored the infections for up to 9 months and observed that after 90 days (data not shown) the mycetoma lesions that had formed did not heal spontaneously; on the contrary, they continued to grow and formed very large, deforming mycetomas.

The results of the study of the effects of 4 weeks of therapy on the development of mycetoma in BALB/c mice are shown in Table 4. We observed the production of 4+ lesions in 9 of 15 animals injected with saline solution. Only two animals in the group treated with linezolid had 4+ lesions. When the results were analyzed by the ANOVA test (Fig. 3), the results for the group treated with linezolid were significantly different from those for the control group. The results for the animals treated with amikacin and amoxicillin-clavulanate were intermediate.

DISCUSSION

Many *in vitro* studies of the sensitivities of *Nocardia* to antimicrobials have been reported; however, in most of them the investigators have used *N. asteroides* or other *Nocardia* species as the test organism or have included few ($n < 20$) *N. brasiliensis* strains (2, 3, 4, 5, 29, 31, 34, 35). In the present work we studied the sensitivities of local *N. brasiliensis* strains to a wide range of antimicrobials. We observed that the strains were particularly sensitive to aminoglycosides, including the recently developed aminoglycoside isepamicin. In our 20 years of experience in treating mycetoma with the combination amikacin-SXT, most of the *N. brasiliensis* actinomycetoma cases

TABLE 4. Effects of the antimicrobials on the natural course of *N. brasiliensis* infection in BALB/c mice

Degree of infection	No. of animals ^a			
	Saline solution	Linezolid (25 mg/kg)	Amoxicillin-clavulanic acid (25 mg/kg)	Amikacin (25 mg/kg)
4+	9	2	3	5
3+	1	0	0	3
2+	0	0	2	1
1+	2	2	2	1
±	0	4	3	0
Negative	3	7	5	5

^a The numbers of animals with the indicated degree of infection in each treatment group.

have been sensitive to this combination therapy; one patient, however, was successfully treated with netilmicin (Welsh and Vera Cabrera Abstr. 15th Cong. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol.) Sisomicin and netilmicin are structurally different from the rest of the aminoglycosides; therefore, the existence of cross-resistance between amikacin and netilmicin is less probable, which correlates with this clinical observation. No other aminoglycosides have been used in clinical trials, but because of the high degrees of sensitivity of the *N. brasiliensis* strains to these agents, these antimicrobials, particularly the less toxic compounds, such as isepamicin and arbekacin, could potentially be useful for the treatment of actinomycetoma (21).

The beta-lactams were poorly active in our study; one of the penicillins tested, carbenicillin, was active against only 3.4% of the *N. brasiliensis* clinical isolates. In contrast, Wallace et al. (32), who also used the disk diffusion technique, found that 100% of the *N. brasiliensis* strains tested ($n = 29$) were sensitive (inhibition halo, more than 16 mm). Under our conditions (carbenicillin disk of 100 µg), 16 strains did not produce any inhibition zone at all, and only 5 strains showed an inhibition zone of more than 16 mm. These results were confirmed with our quality control strains, *E. coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and suggest the existence of differences in the sensitivities of *N. brasiliensis* strains to the antimicrobials, depending on the geographical source. Differences in sensitivity results for cefotaxime and ceftriaxone between our study and previous studies were also found. These drugs have been reported to be active against 100% of the *N. brasiliensis* strains tested (6, 20, 33); however, in the present work these drugs did not have remarkable activities, and in the case of ceftriaxone, more than 50% of the strains were intermediate or resistant by the broth microdilution method. Cefotaxime was of particular interest: 37% of the strains tested (data not shown) presented no inhibition halo in the disk diffusion assays, while the rest of the isolates presented large zones of inhibition (range, 11 to 52 mm; mean, 23.6 mm). It is possible that the species *N. brasiliensis* contains subspecies, as has been demonstrated before for the species formerly known as the *N. asteroides* complex (38), although this possibility was not studied further.

Increases in sensitivity were observed when beta-lactams were tested in combination with a beta-lactamase inhibitor, particularly with the combination amoxicillin-clavulanic acid. This *in vitro* finding has been reported previously (33), and on the basis of these data, amoxicillin-clavulanic acid has successfully been used as treatment for a few cases of cutaneous *N. brasiliensis* infection (9, 26, 39). However, more extensive clinical trials should be carried out since the combination amoxicillin-clavulanic acid is not active *in vitro* against 100% of strains, and secondary resistance has seldom been reported to occur (28).

Nitroxolin and spiramycin, two drugs not previously tested against *Nocardia*, were active against more than 66% of the strains by the disk diffusion method, and the MICs of both drugs by the broth microdilution method were excellent. These findings make these agents good candidates for testing in an animal model in order to determine their usefulness *in vivo*.

Quinolones such as ciprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, and pefloxacin did not show any significant activity against the *N. brasiliensis* isolates. These drugs have been reported to be

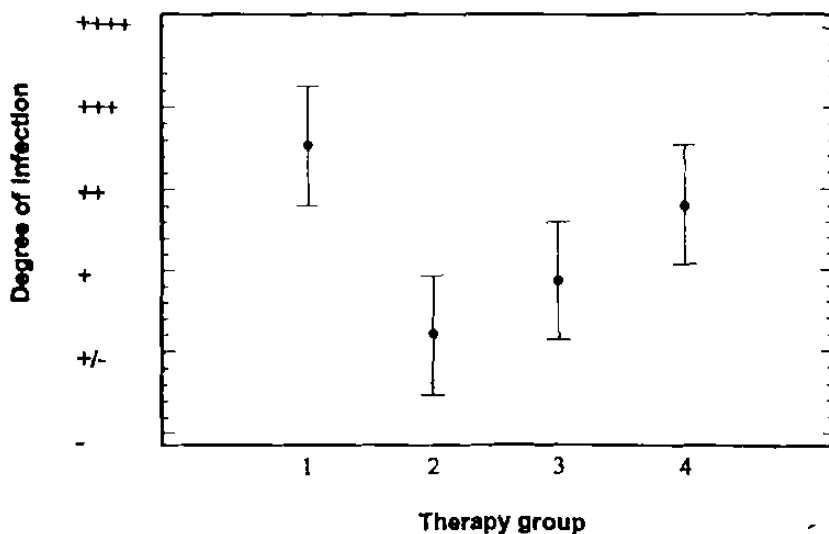


FIG. 3. Analysis of the results for the animal model by the ANOVA test. The intervals shown are based on the least significant difference obtained by the Fisher method. The following treatments are represented on the x axis: 1, saline solution; 2, linezolid, 25 mg/kg; 3, amoxicillin-clavulanic acid, 25 mg/kg; and 4, amikacin, 25 mg/kg.

particularly active against gram-negative microorganisms (1, 13), and quinolones have traditionally been known to be poorly active against *N. brasiliensis*. New quinolones, such as gatifloxacin, moxifloxacin, and BMS-284756, have shown more promising activities (29; L. Vera-Cabrera, E. González, S. H. Choi, and O. Welsh, submitted for publication).

Teicoplanin, a relatively new glycopeptide, showed very poor activity against the *N. brasiliensis* isolates. These results confirm a previous observation of the sensitivities of several *Nocardia* species to this agent (14).

The results of the present study show that other antimicrobials may be useful for the treatment of *N. brasiliensis* infections. Although in vitro activity is strongly indicative of in vivo activity, as has been demonstrated in the case of amoxicillin-clavulanic acid, amikacin, and SXT, it is necessary to confirm the potential clinical use of any of these drugs with animal studies. In our in vivo experiments with the murine mycetoma model, we observed that amikacin had very low levels of activity against the development of lesions. Although this drug has been shown to be active against *N. brasiliensis* in in vitro assays and in patients, it is possible that the drug did not work in mice because it is metabolized very rapidly and does not reach levels in plasma or infected tissue sufficient to inhibit nocardial growth. It would be important to determine the pharmacokinetics of amikacin or any other drug tested in plasma or tissue in this BALB/c mouse model before its effect on the natural course of infection is studied.

As opposed to amikacin, linezolid produced good results in the experimental model, and the results obtained with linezolid were even better than those obtained with the combination of amoxicillin and clavulanic acid, which has been demonstrated to be active against human *N. brasiliensis* infections. Studies of the pharmacokinetics of linezolid at a dose of 5 mg/kg in mice have resulted in a half-life of 0.63 h and a maximum concentration in serum of 5.19 mg/ml (J. J. Lee, J. H. Kim, S. H. Choi,

W. B. Im, and J. K. Rhee, Abstr. 42nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. F-1315, 2002). These conditions seem to be enough to stop the production of lesions in the mouse footpad. Linezolid administered at a dose of 600 mg to humans has a half-life of 5.4 h, a maximum concentration in serum of 21.2 mg/ml, and a minimum concentration in serum of 4 µg/ml for about 12 h (27); these findings are promising for the use of linezolid for the treatment of human infections, since the levels in serum remain above the MIC for the *N. brasiliensis* isolates for 12 h. Moylett et al. (23) have reported on the use of linezolid (600 mg administered twice a day orally for 2 months) to treat a patient with cutaneous *N. brasiliensis* infection that resulted in clinical cure. No other studies on the clinical use of linezolid for the treatment of *N. brasiliensis* infection have been conducted, although on the basis of the results obtained in the in vitro and mouse model assays, the use of oxazolidinones like linezolid for the treatment of mycetoma caused by *N. brasiliensis* seems to be promising.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work was supported by grant 31015-M from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and grant SA 600-01 from the Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT), U.A.N.L.

We thank Robert Chandler-Burns for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Alos, J. I. 2003. Quinolones. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* 21:261–268. (In Spanish.)
2. Ambaye, A., P. C. Kohner, P. C. Wollan, K. L. Roberts, G. D. Roberts, and E. D. Cockerill. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 35:847–852.
3. Bach, M. C., L. D. Sahath, and M. Finland. 1982. Susceptibility of *Nocardia asteroides* to 45 antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:554–559.
4. Berkey, P., D. Moore, and K. Ralston. 1988. In vitro susceptibilities of

- Nocardia* species to newer antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1078-1079.
5. Boiron, P., and F. Provost. 1982. In vitro susceptibility testing of *Nocardia* spp. and its taxonomic implication. *J. Antimicrob. Chemother.* 22:623-629.
 6. Brown-Elliott, B. A., and R. J. Wallace. 1992. Broth microdilution MIC test for *Nocardia* spp., p. 5-12. In H. D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 7. Brown-Elliott, B. A., S. C. Ward, C. J. Crist, L. B. Munn, R. W. Wilson, and R. J. Wallace. 2001. In vitro activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1295-1297.
 8. Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering. 1996. Antimicrobial combinations, p. 330-396. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
 9. Gomez, A., A. Saul, A. Bonifaz, and M. Lopez. 1993. Amoxicillin and clavulanic acid in the treatment of actinomycetoma. *Int. J. Dermatol.* 32:218-220.
 10. González-Ochoa, A., J. Shields, and P. Vázquez. 1952. Accion de la 4-4 diamino-difenil-sulfona frente a *Nocardia brasiliensis* (estudios in vitro en la infección experimental y en clinica). *Gac. Med. Mex.* 52:345-353.
 11. González-Ochoa, A. 1955. Effectiveness of DDS in the treatment of chromoblastomycosis and of mycetoma caused by *Nocardia brasiliensis*, p. 321-327. In *Therapy of fungus diseases*, an international symposium. Little, Brown & Co., Boston, Mass.
 12. González Ochoa, A. 1969. Producción experimental del micetoma por *Nocardia brasiliensis* en el ratón. *Gac. Med. Mex.* 99:773-781.
 13. Hoban, D. J. 1989. Comparative in vitro activity of quinolones. *Clin. Investig. Med.* 12:10-13.
 14. Jensen, K. T., H. Schonheyder, C. Pers, and V. F. Thomsen. 1992. In vitro activity of teicoplanin and vancomycin against gram-positive bacteria from human clinical and veterinary sources. *APMIS* 100:543-552.
 15. Lavallo, P., A. Saul, and J. Peniche. 1961. La sulfadimetoxipiridazina en el tratamiento de los micetomas, p. 525-535. In *I Congress of Mexican Dermatology*, Mexico City, Mexico.
 16. Lavallo, P. 1966. Clinical aspects and therapy of mycetoma. *Dermatol. Int.* 5:117-120. (In Spanish.)
 17. López-Martínez, R., L. J. Méndez-Tovar, P. Lavallo, O. Welsh, A. Saul, and E. Macotela-Ruiz. 1992. Epidemiología del micetoma en México: estudio de 2105 casos. *Gac. Med. Mex.* 128:477-481.
 18. Mahgoub, E. S. 1972. Treatment of actinomycetoma with sulfamethoxazole plus trimethoprim. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:332-335.
 19. Mahgoub, E. S. 1976. Medical management of mycetoma. *Bull. W. H. O.* 54:303-311.
 20. McNeil, M. M., J. M. Brown, W. R. Jarvis, and L. Ajello. 1990. Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.* 12:778-783.
 21. Mingot-Leclercq, M. P., and P. M. Tulkens. 1999. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1003-1012.
 22. Mishra, S. K., R. E. Gordon, and D. A. Barnett. 1980. Identification of nocardiae and streptomycetes of medical importance. *J. Clin. Microbiol.* 11:728-736.
 23. Moylett, E. H., S. E. Pacheco, B. A. Brown-Elliott, T. R. Perry, E. S. Buescher, M. C. Birmingham, J. J. Schentag, J. F. Gimbel, A. Apodaca, M. A. Schwartz, R. M. Rakita, and R. J. Wallace, Jr. 2003. Clinical experience with linezolid for the treatment of *Nocardia* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36:113-118.
 24. NCCLS. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes, approved standard. NCCLS document M24-A. NCCLS, Wayne, Pa.
 25. Ndiaye, B., M. Develoux, M. A. Langlade, and A. Kane. 1994. Actinomycetoma. A propos of 27 cases in Dakar, medical treatment with cotrimoxazole. *Ann. Dermatol. Venerol.* 121:161-165.
 26. Nolt, D., R. M. Wadowsky, and M. Green. 2000. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection: a pediatric case cured with amoxicillin/clavulanate. *Pediatric Infect. Dis. J.* 19:1023-1025.
 27. Pigrau, C. 2003. Oxazolidinones and glycopeptides. *Enteric. Infect. Microbiol. Clin.* 21:157-164. (In Spanish.)
 28. Steingrube, V. A., R. J. Wallace, B. A. Brown, Y. Pang, B. Zcluf, L. C. Steele, and Y. Zhang. 1991. Acquired resistance of *Nocardia brasiliensis* to clavulanic acid related to a change in beta-lactamase following therapy with amoxicillin/clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:524-528.
 29. Valera, L., E. Gradelski, E. Hucsko, T. Washo, H. Yigit, and J. Fung-Tome. 2002. In vitro activity of a novel des-fluoro(6) quinolone, garenoxacin (BMS-284756), against rapidly growing mycobacteria and *Nocardia* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:140-142.
 30. Vera-Cabrera, L., A. Gomez-Flores, W. G. Escalante-Fuentes, and O. Welsh. 2001. In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial, against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3629-3630.
 31. Wallace, R. J., E. J. Septimus, D. M. Muñér, and R. R. Martin. 1977. Disk diffusion susceptibility testing of *Nocardia* species. *J. Infect. Dis.* 135:568-576.
 32. Wallace, R. J., K. Wiss, R. Curvey, P. H. Vance, and J. Steadham. 1983. Differences among *Nocardia* spp. in susceptibility to aminoglycosides and beta-lactam antibiotics and their potential use in taxonomy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:19-21.
 33. Wallace, R. J., D. R. Nash, W. K. Johnson, L. C. Steele, and V. A. Steingrube. 1987. β -Lactam resistance in *Nocardia brasiliensis* is mediated by β -lactamase and reversed in presence of clavulanic acid. *J. Infect. Dis.* 156:959-966.
 34. Wallace, R. J., Jr., and L. C. Steele. 1988. Susceptibility testing of *Nocardia* species for the clinical laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 9:155-166.
 35. Wallace, R. J., Jr., L. C. Steele, G. Sumter, and J. M. Smith. 1988. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1776-1779.
 36. Welsh, O., E. Saucedo, J. Gonzalez, and J. Ocampo. 1987. Amikacin alone and in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17:443-448.
 37. Welsh, O. 1991. Mycetoma: current concepts in treatment. *Int. J. Dermatol.* 30:387-398.
 38. Wilson, R. W., V. A. Steingrube, B. A. Brown, Z. Blacklock, K. C. Jost, Jr., A. McNabb, W. D. Colby, J. R. Biehle, J. L. Gibson, and R. J. Wallace, Jr. 1997. Recognition of a *Nocardia transvalensis* complex by resistance to aminoglycosides, including amikacin, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35:2235-2242.
 39. Wortman, P. D. 1993. Treatment of *Nocardia brasiliensis* mycetoma with sulfamethoxazole and trimethoprim, amikacin and amoxicillin and clavulanate. *Arch. Dermatol.* 129:564-567.

