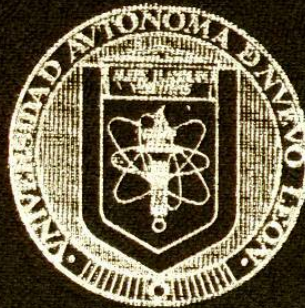


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LA
SENSIBILIDAD DE *Actinomyces madurae* FRENTE
A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS DE RECIENTE
DESARROLLO

Por

Q.F.B. ELSA YAMIN OCHOA FELIX

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en
Microbiología Médica

Agosto, 2004

TM

QR82

.A35

O3

2004

c.1

Q.F.B. YAMMIN OCHOA FELIX
ELSA FELIX



1080126000

esto es como para
fijon de entro
calidad
reliable

esto es como para
fijon de entro
calidad
reliable

esto es como para
fijon de entro
calidad
reliable

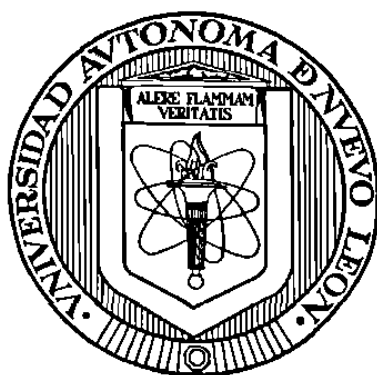
esto es como para
fijon de entro
calidad
reliable

esto es como para
fijon de entro
calidad
reliable

esto es como para
fijon de entro
calidad
reliable

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LA SENSIBILIDAD DE *Actinomadura madurae*
FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS DE RECIENTE DESARROLLO**

Por

Q.F.B. ELSA YAMÍN OCHOA FÉLIX

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con
especialidad en Microbiología Médica**

Agosto, 2004

TM
QR82
A35
030
2004

**ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA SENSIBILIDAD DE *Actinomadura madurae*
FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS DE RECIENTE DESARROLLO**

Aprobación de la Tesis:



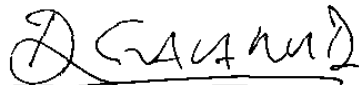
DR. LUCIO VERA CABRERA
Director de Tesis



DR. OLIVERIO WELSH LOZANO
Co-Director de Tesis



DRA. GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Sudirector de Investigación y Estudios de Posgrado

**ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA SENSIBILIDAD DE *Actinomadura madurae*
FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS DE RECIENTE DESARROLLO**

Presentado por:

Q.F.B. ELSA YAMÍN OCHOA FÉLIX

Este trabajo se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “ José Eleuterio González”, en el Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, Departamento de Cirugía Experimental y Bioterio, bajo la dirección del Dr. Lucio Vera Cabrera y la co-dirección del Dr. Oliverio Welsh Lozano y la Dra. Gloria María González González.


FIRMAS

DIRECTOR



Dr. Lucio Vera Cabrera

Co-Director


Dr. Oliverio Welsh Lozano

Co-Director


Dra. Gloria María González González

No podemos elegir muchos aspectos
de nuestra vida. Pero nada ni nadie
es lo bastante poderoso para
impedir que escojamos nuestros
pensamientos y nuestras emociones.
He aprendido que el mundo quiere vivir
en la cima de la montaña,
sin saber que la verdadera felicidad
está en la forma de subir la escarpada.
* Gabriel García Márquez

Gracias a todas aquellas personas
que de algún modo u otro han
compartido este proyecto conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y permitir que la viva en su presencia, por darme fuerza y ayudarme en todo momento.

A mis padres, por su gran amor, por enseñarme a luchar en la vida y por estar junto a mi pesar de la distancia.

A mis hermanos, por su cariño y comprensión, por su ayuda invaluable en todo momento y por estar siempre cuando los he necesitado.

A mi esposo Carlos Villa, por su gran amor e infinita paciencia, por compartir su vida conmigo y por enseñarme a vivir plenamente.

A mi hija Sofia, un ángel que Dios me envió para que me guiara y cuidara en este mundo, gracias por alegrar mi vida con tu sonrisa.

A mis asesores, Dr. Oliverio Welsh Lozano, Dra. Gloria María González González y con especial admiración al Dr. Lucio Vera Cabrera, por asignarme un trabajo de tesis muy interesante, del cual aprendí mucho, gracias por todos sus consejos y regaños, por el tiempo dedicado a enseñarme, muchas gracias.

A todo el departamento de Microbiología, especialmente a mis maestros, MC, Irma Salinas, Dra. Elvira Garza, Dra. Socorro Flores, MC Elba Rodriguez y a los chicos del tercer piso, Rosaura, Carlos, Angelitos y Dona Eva..

A mis compañeras del LIID, Eva González, Sonia Quijano y la Dra. Elisa Moreno, por compartir su tiempo y el laboratorio conmigo.

A todos mis amigos, especialmente a MC. Carmen Amelia Molina Tores, QFB. Wendy Gpe.Escalante , MC. Marcela del Carmen Orozco Hayek, QFB Xóchitl Sofia Ramírez y QFB Yolanda Alcaraz, gracias por su amistad y cariño y por hacerme sentir en mi casa.

A Mariana Armenta, Yerén Escobedo, Marcia Torres, Rebeca Garay, y Jesús Manuel López por su amistad y cariño a pesar de la distancia.

Agradezco a CONACYT por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios y todo el apoyo recibido.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción del micetoma.....	1
1.2 Epidemiología.....	2
1.3 Etiología.....	3
1.3.1 Generalidades de los actinomicetos.....	3
1.3.2 Antecedentes del género <i>Actinmadura</i>	4
1.4 Estudios de sensibilidad <i>in vitro</i> contra <i>A. madurae</i>	6
1.5 Tratamiento.....	6
1.6 Hipótesis.....	13
1.7 Objetivo del trabajo.....	13
1.7.1 Objetivo general.....	13
1.7.2 Objetivos específicos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Área de trabajo y equipo.....	15
2.2 Material biológico.....	16
2.3 Origen de los antimicrobianos.....	17
2.4 Estrategia general.....	18
2.5 Medidas de seguridad.....	21
2.6 Procedimiento para la siembra.....	22
2.7 Evaluación del crecimiento.....	23
2.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	23
2.8.1 Reparación del inóculo.....	24
2.9 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	25
2.10 Efecto de la combinación de los antimicrobianos en el CMI.....	25
2.11 Desarrollo experimental del micetoma por <i>A. madurae</i> en ratones BALB/c.....	27
3. RESULTADOS.....	30
3.1 Evaluación del crecimiento de <i>A. madurae</i>	31
3.2 Determinación de la CMI de <i>A. madurae</i> contra los diversos antimicrobianos.....	31
3.3 Comparación del efecto de las quinolonas (gatifloxacina, moxifloxacina y garenoxacina) contra amikacina sobre <i>A. madurae</i>	33
3.4 Comparación del efecto de las oxazolidinonas (linezolid y DA-7867) contra amikacina sobre <i>A. madurae</i>	34
3.5 Comparación de la CMI y CMB de las quinolonas contra amikacina sobre <i>A. madurae</i>	35

3.6 Comparación de la CMI y CMB de las oxazolidinonas contra amikacina sobre <i>A. madurae</i>	36
3.7 Comparación de la CMI y CMB del SXT sobre <i>A. madurae</i>	37
3.8 Efecto de la combinación de los diferentes antimicrobianos en el CMI sobre <i>A. madurae</i>	38
3.9 Desarrollo experimental del micetoma en ratones BALB/c.....	39
4. DISCUSIÓN.....	41
5. CONCLUSIONES.....	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	49
7. APENDICES.....	52
APÉNDICE A: ORIGEN DE LAS CEPAS DE <i>A. madurae</i>	52
APÉNDICE B: ESQUEMA DE ESTRATEGIA GENERAL.....	53
APÉNDICE C: PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	54
APÉNDICE D: ARTÍCULO PUBLICADO.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Valores del CMI de <i>A. madurae</i> contra los diversos antimicrobianos.....	31
II. Valores del CMI de los antimicrobianos contra <i>A. madurae</i>	32
III. Actividad de los diversos antimicrobianos contra las cepas control.....	33
IV. CMI de las cepas control.....	33
V. Efecto de la combinación de los antimicrobianos en el CMI.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de la técnica del tablero.....	20
2. Cultivo de <i>A. madurae</i> en placas de agar sangre cepa ATCC 19425.....	30
3. Cultivo de <i>A. madurae</i> en placas de agar sangre cepa INDRE 4726.....	30
4. Prueba de hidrólisis de caseína sobre <i>A. madurae</i>	30
5. Prueba de hemólisis sobre <i>A. madurae</i>	30
6. Comparación de la sensibilidad de las quinolonas contra amikacina sobre <i>A. madurae</i>	34
7. Comparación de la sensibilidad de las oxazolidinonas contra amikacina sobre <i>A. madurae</i>	35
8. Efecto de gatifloxacina sobre <i>A. madurae</i>	36
9. Efecto de moxifloxacina sobre <i>A. madurae</i>	36
10. Efecto de la garenoxacina sobre <i>A. madurae</i>	36
11. Efecto de la amikacina sobre <i>A. madurae</i>	36

Figura	Página
12. Efecto de linezolid sobre <i>A. madurae</i>	37
13. Efecto de DA-7867 sobre <i>A. madurae</i>	37
14. Efecto de amikacina sobre <i>A. madurae</i>	37
15. Efecto de SXT sobre <i>A. madurae</i>	38
16. Desarrollo experimental del micetoma en ratones BALB/c.....	40

NOMENCLATURA

Gr	Gramo
Mg	Miligramo
Kg	Kilogramo
µg	microgramos
Mm	Milímetro
mL	Mililitro
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
DAP	Diaminopimérico
SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprim
DDS	Diaminodifenilsulfona
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
INDRE	Instituto nacional de referencia epidemiológica
M-H	Mueller- Hinton
BHI	Agar de infusión cerebro y corazón
UFC	Unidades formadoras de colonia
CIF	Concentración inhibitoria fraccional
NCCLS	Comité nacional para estándares de laboratorio
Rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

Elsa Yamín Ochoa Félix

Fecha de graduación: Agosto del 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

**Título del Estudio: ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA SENSIBILIDAD DE
Actinomadura madurae FRENTE A DIVERSOS
ANTIMICROBIANOS DE RECIENTE DESARROLLO**

Número de páginas: 55


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

Área de Estudio: Microbiología Médica

Propósito y Método del Estudio: El micetoma es una enfermedad producida por múltiples agentes etiológicos entre los que destacan los géneros *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*. El micetoma causado por *Actinomadura madurae* ha sido reportado en diversas regiones del mundo, tales como: Senegal, Venezuela, Rusia, y México. Diversos antimicrobianos han sido utilizados en la terapia de micetoma por *Actinomadura* y algunas de ellas presentan importantes efectos adversos entre los que destacan problemas hepáticos, auditivos o renales; recientemente se han desarrollado antimicrobianos nuevos y más potentes, por lo que consideramos importante evaluar su actividad para obtener una nueva alternativa terapéutica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de diversos antimicrobianos de reciente desarrollo en cepas procedentes de pacientes con micetoma por *A. madurae*. Ensayamos la sensibilidad de 24 cepas de *A. madurae* aisladas de micetoma frente a 2 oxazolidinonas (linezolid y DA-7867), así como varias quinolonas de reciente desarrollo incluyendo gatifloxacin, moxifloxacin y garenoxacin, utilizando para ello el método de microdilución en caldo. Se estudio además la sensibilidad al trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), amikacina y algunas combinaciones entre estos antimicrobianos probados con el objetivo de evaluar si existe alguna relacion sinérgica o aditiva entre estos. Con la finalidad de desarrollar métodos efectivos de diagnóstico y tratamiento es necesario contar con un modelo experimental conveniente que nos permita determinar el efecto *in vivo* del antimicrobiano mas activo en un modelo murino. Para ello se siguió la técnica anteriormente utilizada para producir micetoma por *N. brasiliensis*.

Conclusiones y Contribuciones: En este trabajo nosotros observamos una gran sensibilidad de *A. madurae* frente a los antimicrobianos probados, encontrando que la droga con mayor actividad fue el DA-7867. También se encontró que la mayoría de las cepas son sensibles a SXT. Las combinaciones entre estos antimicrobianos presentan poco efecto sinérgico. No se logró establecer el modelo murino en las condiciones experimentales utilizadas por lo que la efectividad de dichos antimicrobianos *in vivo* no pudo ser evaluada.

FIRMA DEL DIRECTOR



Dr. Lucio Vera Cabrera

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del micetoma

El micetoma es una infección crónica de la piel, que afecta el tejido subcutáneo y en casos severos los huesos (1). Se caracteriza por un aumento de volumen relativamente indoloro y fístulas que drenan material seropurulento y granos. La infección se produce por la penetración del agente etiológico a través de heridas en la piel mediante astillas, espinas, etc. El micetoma puede afectar cualquier región corporal, pero se presenta con mayor frecuencia en los miembros inferiores debido al gran número de traumatismos que sufren las personas dedicadas a las labores del campo (1). La enfermedad presenta un periodo de incubación de algunos meses hasta años. Inicialmente puede pasar desapercibido como un quiste o una infección bacteriana (mini-micetoma) que progresa lentamente. La enfermedad se disemina por contigüidad a los tejidos subyacentes, huesos y órganos. La diseminación linfática y hematológica son raras (2,3).

1.2 Epidemiología

El micetoma aunque no representa un problema de salud pública, es importante porque puede generar invalidez del miembro que afecta, y cuando se presenta en localizaciones torácicas o craneales, produce complicaciones severas e inclusive la muerte (1, 2,4).

La prevalencia mundial de los agentes causales varía, siendo mas frecuente en los países situados en el cinturón intertropical (3). La enfermedad es más frecuente en regiones con precipitación pluvial alta, pero también se ha reportado en zonas secas y semiáridas (3). El micetoma causado por *A. madurae* ha sido reportado en muchas regiones del mundo, particularmente en la India, el Sudán, noreste y este de África, México, Venezuela y algunos países de centro y Sudamérica (3); se han reportado casos esporádicos en el sur de Europa, Asia y Estados Unidos (3).

En México, el 10.2% del total de los casos de micetoma son producidos por *A. madurae*; las zonas geográficas donde se observa con mayor frecuencia son: Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Morelos y Guerrero (3).

En general, el micetoma se presenta en ambos sexos, predominando en pacientes del sexo masculino, a excepción de *A. madurae* que se presenta más en el femenino (4). Es más frecuente entre la segunda y cuarta década de la vida y su incidencia es mayor en áreas rurales y afecta particularmente a campesinos, debido quizá a la exposición de este microorganismo en el suelo (1, 2, 4).

1.3 Etiología

Los agentes etiológicos del micetoma son organismos saprófitos que se encuentran habitualmente en el suelo, madera, vegetales y espinas. De acuerdo al agente etiológico los micetomas se dividen en dos grupos, el micetoma eumicético producido por hongos verdaderos y micetoma actinomicético, que es producido por actinomicetos aeróbicos de los géneros *Nocardia*, *Streptomyces* y *Actinomadura*. En México alrededor del 98% de los micetomas son actinomicetomas y el 2% restante son de origen micótico (3).

1.3.1 Generalidades de los actinomicetos

Los actinomicetos y microorganismos relacionados representan el grupo de bacterias más grande y diverso (5). Este grupo está conformado por bacilos filamentosos, grampositivos y unicelulares. Están ubicados en el grupo corineforme y en el orden de los actinomicetales (5). Este último comprende 63 géneros y casi todos sus miembros desarrollan un micelio filamentoso. Los actinomicetales se encuentran distribuidos en diferentes hábitats; su reservorio natural es el suelo en donde su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica (5).

1.3.2 Antecedentes del género *Actinomadura*

El término actinomadura proviene del vocablo griego “actinos” que significa rayo de luz y de “Madura”; nombre de una provincia de la India donde fue descrito originalmente el micetoma (2). El nombre de este género fue propuesto por Lechevalier y Lechevalier en 1970 para agrupar a una serie de actinomicetos aerobios que desarrollan micelio y substrato aéreo, producen esporas y cuyos hidrolizados celulares contienen ácido-meso-DAP (ácido 2, 6 meso- diaminopimelico) y madurosa (3-O-metil-D-galactosa) (5). Estos mismos autores designaron como la especie tipo de este género a *Actinomadura madurae*, uno de los agentes causales de un tipo de micetoma denominado “pie de Madura”. Inicialmente *A. madurae* fue descubierta por Vincent en 1894, y clasificada como *Streptothrix madurae* (5). Posteriormente, en 1896 Blanchard la reclasificó como *Nocardia madurae* (5). En 1906, Laveran describió otro microorganismo causante de la enfermedad de pie de Madura y lo clasificó en primera instancia como *Micrococcus pelletieri* y posteriormente como *Nocardia pelletieri* (5). Tanto *N. madurae* de Blanchard como *N. pelletieri* de Laveran carecían del micelio fragmentado típico de *Nocardia*, considerándose entonces como especies atípicas. En 1965, Becker y colaboradores demostraron que los hidrolizados celulares de estos microorganismos contenían meso-DAP y madurosa. Este descubrimiento llevó a Lechevalier y Lechevalier a proponer el género *Actinomadura* para incluir a estas especies (5).

A. madurae pertenece al orden de los actinomicetales, familia de los maduromicetos, género *Actinomadura*, se localiza en el grupo 26 (Maduromicetos), subgrupo 2 (actinomadura), del manual de bacteriología de Bergey's (6).

Los miembros del género *Actinomadura* se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y de acuerdo a la información más reciente publicada en la literatura científica, este género comprende aproximadamente 27 especies. La mayoría de estas especies son inocuas para los animales y el hombre, solamente las especies *A. madurae*, *A. latina* y *A. pelletieri* han sido relacionadas como agentes causales de actinomicetomas. (6).

Los microorganismos del género *Actinomadura* son bacterias grampositivas, no-alcohol resistentes, aerobias, quimiorganotrópicas, que no poseen ácidos micólicos y que crecen en un intervalo de temperatura de 10-60°C. Prácticamente todas las especies desarrollan un micelio aéreo, el cual puede presentar diversas coloraciones (7).

En los casos de micetoma, *A. madurae*, produce granos blancos y blandos, que miden de 1 a 10 mm de diámetro y que se pueden identificar al examen directo por su gran tamaño y sus bordes cartográficos. En los cortes histopatológicos se observan granos multilobulados con bordes festonados o cartográficos y tienen una banda periférica que se tiñe intensamente de azul. El centro en cambio, está a menudo desprovisto de color; estos granos están rodeados por franjas de flecos largos, constituidos por filamentos frecuentemente bifurcados (4).

A. madurae crece lentamente en un mes o más a la temperatura de laboratorio o más rápidamente a 37°C, en glucosa agar de Sabouraud, sin antibióticos antibacterianos, o en medio de Lowenstein. Las colonias son plegadas o cerebriformes con un aspecto ceroso, de color amarillento, blanco, rosado o rojo (2,4).

1.4 Estudios de susceptibilidad *in vitro* contra *A. madurae*

Son escasos los estudios reportados de sensibilidad *in vitro* contra *A. madurae*, de ellos solo destacan los siguientes trabajos realizados:

En 1976, Carrols y cols, evaluaron la sensibilidad de diversos antimicrobianos sobre 3 cepas de *A. madurae*, utilizando el método de dilución en placas de agar, encontrando que esta bacteria es sensible a kanamicina, gentamicina, eritromicina, entre otros (8).

En 1990, Mc Neil M.M, y cols realizaron pruebas de susceptibilidad contra varios actinomicetos incluyendo *A. madurae*, reportando la sensibilidad de esta bacteria contra ampicilina, eritromicina, imipenem, entre otros; sin embargo en ninguno de estos trabajo se evaluó los antimicrobianos de reciente desarrollo utilizados en este estudio (9).

1.5 Tratamiento

El tratamiento más apropiado y la duración de la terapia para pacientes con infecciones causadas por *A. madurae* se desconoce, sin embargo existen algunos estudios realizados en donde se observa que ciertos antimicrobianos han resultado útiles para el tratamiento del micetoma, destacando las drogas que se mencionan a continuación:

Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT):

La introducción del trimetoprim en combinación con el sulfametoxazol constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos clínicamente eficaces en la terapia del actinomicetoma. El espectro antimicrobiano del trimetoprim (TMP) es semejante al del sulfametoxazol (SMX), casi todos los microorganismos gramnegativos y grampositivos son sensibles al trimetoprim. El SMX inhibe la síntesis de ácido dihidroptérico compitiendo con el ácido p-aminobenzoico (10). El TMP se une a la reductasa del dihidrofolato impidiendo la transformación del ácido dihidrofólico en ácido tetrafólico (10). Este bloqueo enzimático secuencial es lo que le da al SXT su actividad antimicrobiana.

La toxicidad selectiva contra los microorganismos se logra de dos maneras: Las células de mamíferos utilizan folatos preformados obtenidos de alimentos y no los sintetizan. Aún más el TMP es un bloqueador altamente selectivo de la dihidrofolato reductasa de microorganismos inferiores, y se necesitan 100 000 veces más fármaco para inhibir la reductasa humana que dicha enzima en bacterias. La frecuencia con que aparece resistencia bacteriana al SXT es menor que la que surgiría empleando uno u otro por separado.

Sus efectos colaterales son: náusea, vómitos y diarrea ocurren en 0.6 a 4% de los pacientes. Los efectos hematológicos sólo se observan en terapia prolongada en pacientes desnutridos, alcohólicos o en mal estado general por enfermedad de base crónica. Otros efectos incluyen hiperbilirrubinemia en el recién nacido, hepatitis, cefalea, confusión, depresión y daño renal pasajero. Las lesiones dermatológicas que ocurren como toxicidad

a SXT incluyen: eritema tóxico, eritema nodoso, eritema multiforme, urticaria, síndrome de piel escaldada, dermatitis exfoliativa, urticaria, vasculitis y fotodermatitis (10,11, 12).

Se ha reportado el uso de este antimicrobiano solo o en combinación en el tratamiento del micetoma por *A. madurae* (3).

En 1973, Mahgoub reportó el uso de estreptomicina (1g/día) más SXT(400-80 mg/día) como tratamiento para el micetoma causado por *A. madurae*; sin embargo, un buen número de casos no respondieron (2).

En el 2002, Lavalle P. y colaboradores reportaron el uso de diamino-difenil-sulfona (DDS) y SXT para el tratamiento de los micetomas por *A. madurae*. Con este tratamiento la respuesta no fue del todo satisfactoria en estos micetomas especialmente cuando hay compromiso óseo, en estos casos se utilizó kanamicina mas SXT, obteniendo resultados satisfactorios (4).

Amikacina:

Este antibiótico pertenece al grupo de los aminoglucósidos ya que contiene aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a otros aminoazúcares. Se utiliza clínicamente en infecciones causadas por bacterias gramnegativas.

La amikacina por su resistencia peculiar a enzimas inactivadoras de aminoglucósidos, es activa contra muchos de los bacilos gramnegativos aerobios de origen comunitario y nosocomial, donde la resistencia a gentamicina y tobramicina se ha vuelto un problema importante. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas, al fijarse a proteínas ribosómicas específicas de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano por 3 mecanismos diferentes: 1) inhibe el comienzo de la síntesis de proteínas, 2) impide

el alargamiento de la cadena polipeptídica y 3) aumenta la frecuencia de lecturas erróneas del código genético, dando como resultado proteínas estructuralmente anómalas (13).

Varios autores han reportado el uso de este aminoglucósido en el tratamiento del micetoma por *A. madurae*. En 1989, Welsh en su tesis doctoral reportó un estudio de 26 pacientes con actinomietoma: 25 de ellos causados por *N. brasiliensis*, 2 por *A. madurae* y uno por *N. asteroides*. Estos pacientes no presentaban ninguna alteración auditiva, renal o hepática, y todos ellos se trataron con ciclos combinados con amikacina y SXT, obteniendo curación en 21 de ellos (14). Cabe mencionar que esta combinación de antimicrobianos es la que se utiliza actualmente en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Nuevo León como tratamiento del micetoma causado por *N. brasiliensis* y por *A. madurae*. Asimismo se reportó un caso al Laboratorio de Actinomicetos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), donde *A. madurae* causó peritonitis en un paciente que fue sometido a diálisis peritoneal ambulatoria por largo tiempo y no contaba con antecedentes de haber viajado a regiones tropicales. Interesantemente, este paciente respondió a la infección con tratamiento intraperitoneal a base de amikacina (15).

El uso de aminoglucósidos está contraindicado en pacientes con problemas hepáticos, auditivos o renales. Sus efectos colaterales incluyen reacciones alérgicas con exantema, fiebre, eosinofilia, nefrotoxicidad reversible, ototoxicidad irreversible, bloqueo neuromuscular y apneas neonatales (10).

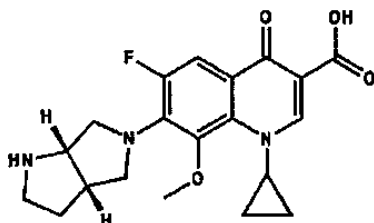
Recientemente, debido a la aparición de la resistencia global de las bacterias a los medicamentos se han desarrollado antimicrobianos nuevos y más potentes, los cuales se

pueden considerar como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del micetoma causado por *A. madurae*. De estos antimicrobianos seleccionamos los siguientes:

Quinolonas:

Desde la síntesis en 1962 del ácido nalidíxico, considerado como la primera quinolona con actividad antibacteriana, este grupo de antimicrobianos ha experimentado un desarrollo espectacular, favorecido por la posibilidad de modificar su estructura básica y por la mejora de sus propiedades farmacocinéticas (16). Las quinolonas poseen una estructura común: la 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, de la cual derivan las quinolonas fluoradas y las no fluoradas. Su núcleo central es el 7-piperazino-4-quinolona, al que incorporándole uno, dos o tres átomos de flúor en su molécula, da lugar a las llamadas 4-fluorquinolonas (17). La gran mayoría de las quinolonas desarrolladas recientemente se engloban dentro del grupo de las quinolonas fluoradas (gatifloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, etc.)

Formula química de las quinolonas



Gatifloxacin y moxifloxacin

Son quinolonas de cuarta generaci3n, con amplio espectro de acci3n contra cocos grampositivos, enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, at3picos y micobacterias (18). Destaca su actividad contra la cepa de *N. brasiliensis*, microorganismo muy relacionado filogen3ticamente a *A. madurae* (19).

A diferencia de las otras quinolonas, la gatifloxacin y la moxifloxacin ejercen su acci3n por inhibici3n en dos sitios, la DNA girasa y la topoisomerasa IV, las cuales son esenciales para la divisi3n cromos3mica bacteriana. La DNA girasa convierte la espiral del DNA en una forma superhelicoidal negativa para preparar la separaci3n del filamento. La topoisomerasa IV separa los c3rculos ligados que resultan de la duplicaci3n del cromosoma bacteriano (18).

Los efectos adversos m3s comunes con el uso de gatifloxacin han sido n3useas, vaginitis, diarrea, cefaleas, mareos, dolor abdominal, insomnio, y alteraci3n del gusto (18). Eventos adversos menos frecuentes (<1%) reportados incluyen reacciones al3rgicas, fiebre, palpitaciones, glositis, temblor, eritema, visi3n anormal. No se aconseja su uso durante el embarazo o la lactancia (10, 18).

Garenoxacin (BMS-284756):

La garenoxacin pertenece al grupo de las desfluoroquinolonas, ya que carece de un 3tomo de fluor en su estructura. Puesto que se trata de una quinolona, su mecanismo de acci3n es el mismo, aunque presenta una mayor afinidad por la DNA girasa tanto en gramnegativos, como en grampositivos, (incluido *Streptococcus pneumoniae*) y otros (17).

En comparación con la gatifloxacina y la moxifloxacina, la garenoxacina muestra una menor probabilidad de seleccionar mutantes resistentes (16). Se ha reportado su actividad contra, estafilococos, enterococos, *E. coli*, *P. aeruginosa*, así como ureaplasmas y micoplasmas (20, 21).

Oxazolidinonas

Linezolid:

El linezolid es un agente antibacteriano sintético el cual pertenece a una nueva clase de antibióticos, las oxazolidinonas. Este grupo de compuestos inhiben la síntesis de proteínas mediante un mecanismo de acción único, se unen al ribosoma 50S e inhiben la síntesis de proteínas, bloqueando la formación del complejo de iniciación (22). Este hecho determina que, *a priori*, no exista resistencia cruzada con otros antimicrobianos. Son bacteriostáticos como la mayoría de los antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas y se ha reportado su actividad *in vitro* contra ciertas bacterias gramnegativas, microorganismos anaerobios y bacterias grampositivas aerobias incluyendo *Corynebacterium jeikeium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *N. brasiliensis*, bacterias relacionadas con *A. madurae* (17).

Los efectos adversos más comunes con el uso de linezolid han sido diarrea, cefalea, náuseas, vómitos, así como alteraciones en los exámenes de función hepática y/o renal. También se ha reportado eritema cutáneo y más raramente leucopenia o plaquetopenia (22).

DA-7867

Al igual que el linezolid, el DA-7867 pertenece a la familia de las oxazolidinonas. Ha demostrado mayor actividad que el linezolid contra organismos grampositivos, incluyendo a *N. brasiliensis*. El DA-7867 presenta actividad contra microorganismos como *H influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* resistente a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, así como *S. pneumoniae* resistente a penicilina (23, 24).

1.6 Hipótesis

Existen antimicrobianos de reciente desarrollo activos contra cepas de *A. madurae*

1.7 Objetivos del trabajo

1.7.1 Objetivo general

Evaluar la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de diversos antimicrobianos de reciente desarrollo en cepas procedentes de pacientes con micetoma por *A. madurae*.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de gatifloxacina, moxifloxacina, garenoxacina, linezolid, DA-7867, amikacina y SXT contra 24 cepas de *A. madurae*.
2. Estudiar el efecto *in vitro* de la combinación de los antimicrobianos sobre *A. madurae*.
3. Desarrollar un modelo de micetoma por *A. madurae* en ratones BALB/c .

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Área de trabajo y equipo

La parte experimental de este trabajo fue realizada en áreas de trabajo separadas, dependiendo del proceso que se llevó a cabo. La parte correspondiente a los ensayos *in vitro* fue realizada en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de Nuevo León en coordinación con el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El desarrollo del micetoma en ratones BALB/c se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, departamento de cirugía experimental y bioterio, bajo la supervisión del MC. Héctor Gerardo Lozano Garza.

En todos los proceso fueron utilizados los siguientes aparatos: campana de Bioseguridad Clase II type A/B3 (NUAIRE), centrifuga eppendorf (5810R), incubadora VIP CO2 (incubator 417, Lab-Line Instruments) , autoclave (tuttnauer Brikmann 3850 E), autoclave (tuttnauer 2540M), balanza analítica (Mettler AE 100), balanza digital (Sartorius), agitador (thermolyne type 16700 Mixer, Maxi-Mix 1), placa de calentamiento (Nuova II stir plate Sybron thermolyne) , congelador -85C (NUAIRE ultralow Freezer),

Incinerador (Bacti-Cinerator III), Microtiter (Cook Laboratory), rotador orbital (Lab-line) refrigerador (ToRey), vernier y jaulas de policarbonato con rejilla de acero inoxidable.

También se utilizó el siguiente material: tubos estériles de centrifuga de 50 y 15 mL (Corning), tubos de ensaye de 13x100 (Pirex), pipeta lineales de 1, 5 y 10 mL (Pirex), pipeteador automático (Pipet aid, Drummond), multipipeta (Eppendorf research), puntillas blancas y amarillas para pipeta automático), pipetas Pasteur, bulbo insuflador de hule para pipetas Pasteur, gradillas para tubo de ensaye, placas petri desechables de plástico 100x15mm, probeta 100 mL (Pirex), homogenizador de tejidos de vidrio (Wheaton USA 40 mL), frascos de vidrio 44 x 44 mm de 160 mL, contenedores de plástico estériles (Scienceware), matraz erlen meyer 500mL (Schott Duran), matraz erlen meyer de 125mL (Schott Duran), papel parafilm, gasa, algodón, guantes, cubrebocas, asa bacteriológica, aplicadores de madera y jeringas estériles desechables de tuberculina 1 cc/mL (Terumo).

2.2 Material biológico

Se utilizaron 24 cepas de *A. madurae* aisladas de pacientes con micetoma actinomicético, las cuales fueron proporcionadas para el desarrollo de esta investigación por el Q.B.P Cutberto Contreras del Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), México, D.F. (ver tabla 6 en apéndice A). Dichas cepas fueron recolectadas de diferentes lugares, como se puede observar en la tabla 6 del apéndice A.

Como cepas control se utilizaron *N. asteroides* ATCC 19247 y *A. madurae* ATCC 19425. Como controles de ensayo de susceptibilidad se utilizaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para el modelo experimental *in vivo* se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, hembras de 6 a 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 a 30 gr., los cuales se conservaron en el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, departamento de cirugía experimental y bioterio, donde se encontraban bajo supervisión, hasta su posterior utilización. Dichos ratones se alimentaban, *ad libitum* con Lab diet 5001 y agua.

2.3 Origen de los antimicrobianos

El linezolid fue obtenido de Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, MI; el sulfametoxazol, el trimetoprim y la amikacina se obtuvieron de Sigma Chemical Products (San Louis, MO). El DA-7867 fue donado por Dong-A Pharm, Yongin-Si, Korea y la garenoxacina por Bristol-Myers Squibb. Las otras quinolonas, gatifloxacina y moxifloxacina, fueron obtenidas de fuentes comerciales, Bristol Myers squibb (México, S. De R.L. de C. V.) y Bayer respectivamente.

Las drogas en su presentación original fueron almacenadas según se indicaba en su presentación, la gatifloxacina y la moxifloxacina fueron guardadas en refrigeración, el linezolid, el DA-7867 y la garenoxacina en un desecador a 25°C. La amikacina, el trimetoprim y el sulfametoxazol se guardaron a temperatura ambiente. A partir de cada una de estas drogas se prepararon las soluciones madres para su posterior utilización.

2.3.1 Preparación de las soluciones madre de los diversos antimicrobianos

Dependiendo de la concentración original de cada una de estas drogas se realizaron en caldo Mueller-Hinton (Oxoid) diluciones seriadas logarítmicas base 2 hasta una concentración final de 1280 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones madre fueron almacenadas en tubos cónicos de 50 mL en el congelador a una temperatura de -70°C hasta su posterior utilización.

2.3.2 Preparación de las diluciones de los antimicrobianos

Las soluciones madre de los antimicrobianos que estaban en congelación, se dejaron descongelar y a partir de cada uno de ellas se realizaron diluciones seriadas logarítmicas base 2, en tubos cónicos de 50 mL, los cuales contenían caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes. El rango de concentraciones de todas las drogas, excepto el SXT fue de 2 $\mu\text{g/mL}$ a 0.0003 $\mu\text{g/mL}$. El rango de concentraciones para el SXT (razón de 1:20) fue de 0.3/0.015 a 152/8 $\mu\text{g/mL}$.

2.4 Estrategia general

Las cepas de *A. madurae* proporcionadas para el estudio fueron conservadas en criotubos congeladas a -70°C . Al momento de utilizarse se descongelaron y se

resembraron en placas de agar de infusión cerebro y corazón (BHI) (Bioxon) con 5% de sangre de carnero y en frascos de agar dextrosa Saboraud (Bioxon), para su posterior utilización. A partir de este cultivo joven de la bacteria, se preparó una suspensión bacteriana la cual se centrifugó y ajustó a una turbidez equivalente al tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland. Esta densidad equivale a una concentración de 3×10^8 UFC/mL. Dicha suspensión bacteriana se separó en alícuotas que se utilizaron para determinar la (CMI) y el efecto de las combinaciones de antimicrobianos en la CMI. La fracción bacteriana para determinar la CMI, se colocó en placas de microtitulación, las cuales contenían diluciones seriadas de los antimicrobianos a estudiar (ver sección 2.3.2). Las placas se incubaron y al cabo de 72 horas se tomó la lectura del CMI, es decir aquella concentración de antimicrobiano en la cual no se observa crecimiento de la bacteria a simple vista. Una vez obtenido la CMI, se obtuvo la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Para llevar a cabo este procedimiento se tomaron 100 μ L de aquellas diluciones de antimicrobiano en las cuales no se observó crecimiento bacteriano a simple vista. Dichas diluciones fueron sembradas en placas de agar sangre e incubadas a 37°C y después de 72 horas se determinó a que concentración del antimicrobiano no había crecimiento bacteriano, siendo este la CMB. Por otra lado se determinó el efecto de las combinaciones de antimicrobianos en la CMI. Para realizar este ensayo se utilizó el método de diluciones cruzadas. Se realizaron diluciones logarítmicas base 2 de cada uno de los antimicrobianos a probar y se colocaron 100 μ L de estas diluciones en placas de microtitulación y se inocularon con 10 μ l de cada una de las cepas seleccionadas de *A. madurae*. Las placas se incubaron a 37° C por 72 horas. Al cabo de este tiempo se determinó la CMI de cada una de las drogas y de acuerdo al resultado obtenido se calculó

el índice de la concentración inhibitoria fraccional (CIF) para valorar el efecto de la combinación de drogas (25). (Ver esquema de estrategia general en apéndice B)

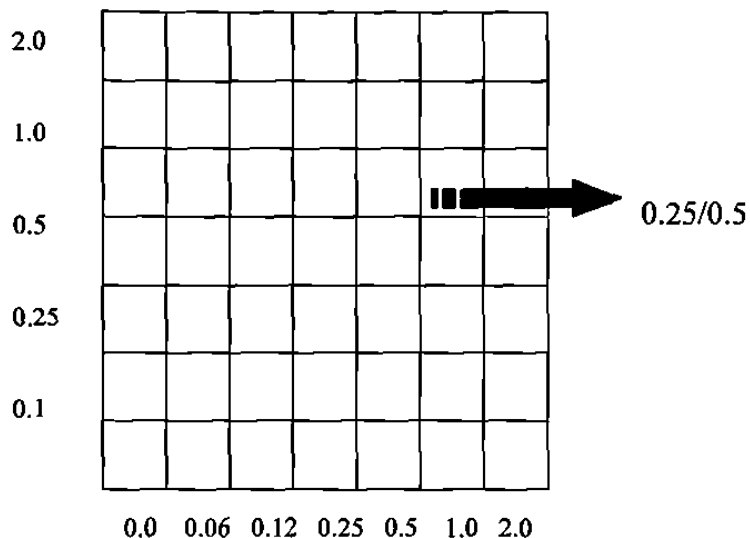


Figura 1. Arreglo de las diluciones de los antimicrobianos de acuerdo a la técnica del tablero. La flecha indica las concentraciones de cada droga en el tubo correspondiente (25).

Para el desarrollo experimental de micetoma en ratones BALB/c, se siguió el procedimiento para producir micetoma por *N. brasiliensis* descrita anteriormente (26). Se utilizaron ratones BALB/c, hembras de 6 a 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 a 30 gr. Se evaluaron 3 grupos de 7 ratones cada uno; al primer grupo se le inocularon 20 mg (peso húmedo) de la cepa de *A. madurae* en el cojinete plantar derecho; el segundo grupo fue inyectado previamente con ciclofosfamida (200 mg/kg peso del ratón) por vía intraperitoneal y posteriormente se inoculó con la misma cantidad de

bacteria que el grupo anterior; un tercer grupo se utilizó como control negativo de infección, al cual se le inyectó únicamente solución salina en el cojinete plantar. Inmediatamente después de la inoculación se registró la dimensión de la pata inoculada utilizando un vernier, esto para evaluar la evolución del micetoma de acuerdo al grado de inflamación. Se registraron las medidas durante 7 semanas.

2.5 Medidas de Bioseguridad

El ensayo experimental *in vitro* se maneja en el nivel de Bioseguridad II. Se utilizó una campana de Bioseguridad clase II de flujo laminar vertical, equipada con un filtro HEPA (NUAIRE type A/B3, Plymouth, MN, USA). Después de realizar las actividades dentro de la campana se desinfectaron las superficies expuestas usando una solución de fenol al 5%.

El ensayo experimental *in vivo* se realizó bajo las siguientes medidas de seguridad. La parte de la inoculación de los ratones se llevó a cabo en un área de trabajo separada. El cuidado de los animales se llevaba a cabo dentro de un área de contención aislada. Después de realizar las actividades dentro de esta área se desinfectó con una solución de glutaraldehído (cydex).

El equipo de protección personal consistió en bata de laboratorio, bata quirúrgica desechable, lentes de seguridad y guantes.

El material contaminado se esterilizó y el material desechable usado, se eliminó en bolsas plásticas y contenedores que se llevaron a un incinerador de residuos biológico-infecciosos. Los ratones utilizados en el ensayo *in vivo* se sacrificaron y se incineraron, para su posterior eliminación.

2.6 Procedimiento para la siembra

El cultivo de las cepas de *A. madurae* en agar sangre y agar Saboraud se llevó a cabo en el interior de la campana de bioseguridad. Las 24 cepas proporcionadas para el estudio se encontraban congeladas en criotubos a -70°C , se esperó un tiempo hasta que alcanzaran la temperatura ambiente, con un asa previamente estéril, se tomaron de dos a tres asadas del contenido de estos criotubos y se sembraron en placas petri de 150 x 100 mm de plástico con agar sangre, asimismo se repitió la toma de muestra con el asa y se sembró en frascos de vidrio que contenían agar Saboraud, previamente identificados con el número correspondiente a cada una de las 24 cepas de *A. madurae*. Una vez realizada la siembra en las placas y frascos de agar se llevaron a incubación a 37°C . Cabe señalar que el cultivo de las cepas de *A. madurae*, así como todos los demás procedimientos de esta investigación se llevaron a cabo en el interior de la campana de bioseguridad.

2.7 Evaluación del crecimiento

Los cultivos se examinaron por primera vez a las 24 horas, con el objeto de observar si alguno estaba contaminado, desechando aquellos cultivos donde se observara contaminación. Los que resultaran contaminados se resembraron nuevamente hasta obtener un cultivo puro. Los cultivos se observaron posteriormente a las 48 y 72 horas, evaluando de esta manera el crecimiento morfológico de las colonias. Este examen se realizó determinando visualmente el tamaño, consistencia, textura y color de las colonias.

2.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

2.8.1 Preparación del inóculo

A partir de un cultivo joven (aproximadamente 7 días) de cada una de las cepas de *A. madurae* se tomaron de dos a tres asadas de las colonias con un aplicador estéril de madera y se colocaron en un tubo de vidrio estéril de 13 x 100 con tapón de rosca, al cual se le había añadido previamente 0.1 mL de solución salina estéril, utilizando para ello una pipeta de vidrio de 1 mL estéril. Posteriormente se llevó a cabo la trituración de la colonia utilizando una varilla de vidrio estéril con extremo romo, por un minuto. Inmediatamente después se le añadió 1.5 mL de solución salina estéril, para resuspender las células bacterianas. Posteriormente esta suspensión se sometió a centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos, para separar los filamentos grandes y masas bacterianas que no fueron suspendidas. Obteniendo la separación de esta suspensión en dos fases. Del sobrenadante que contiene principalmente fracciones unicelulares se obtuvo una

suspensión la cual con ayuda de una pipeta Pasteur, se ajustó con solución salina a una turbidez equivalente al tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland, para ser utilizada posteriormente en cada procedimiento.

2.8.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para realizar este procedimiento se siguieron los lineamientos del Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS) para ensayos de antimicrobianos por dilución en caldo descrito en el documento M7-A4 (27). Los antimicrobianos a evaluar se pesaron en una balanza analítica y se realizaron las diluciones seriadas logarítmica base 2 de cada uno de ellos en tubos cónicos (Corning), utilizando caldo Mueller-Hinton (Oxoid) suplementado con cationes. Todos los antimicrobianos, excepto el SXT fueron utilizados en concentraciones de 2 µg/mL a 0.0003 µg/mL. El SXT (razón de 1:20) fue utilizado en concentración de 0.3/0.015 a 152/8 µg/mL. Una vez realizadas las diluciones de cada uno de los antimicrobianos se colocaron con ayuda de una multipipeta automática 100 µL de cada una de las diluciones de la droga en las respectivas filas de las placas de microtitulación (Microtest primaria, Becton Dickinson and Co, Franklin Lakes, NJ), de menor a mayor gradiente de concentración y se añadieron posteriormente 100 µL de la suspensión bacteriana ya ajustada (ver sección 2.8.1) de cada una de las cepas de *A. madurae* seleccionadas. Asimismo en dichas microplacas se añadió una hilera con un volumen de 0.2 mL de caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes como control negativo de crecimiento y como control positivo se añadió un volumen de 0.1 mL de caldo Mueller-Hinton

suplementado mas 0.1 mL de la suspensión bacteriana ajustada, evaluando de esta manera el desarrollo de la prueba. Las microplacas se incubaron a 37° C y al cabo de 72 horas se tomó la lectura de la CMI. Esto se realizó observando las placas a simple vista con la ayuda de un espejo, considerando como CMI la concentración mas baja del antimicrobiano que inhibe totalmente el crecimiento bacteriano. Para el SXT se considera como CMI la concentración más baja que inhibe el 80% del crecimiento bacteriano comparado con el crecimiento del control negativo, esto debido al efecto de cola que presenta este antimicrobiano. Una vez obtenido la CMI se obtuvo la Concentración Mínima Bactericida (CMB). La CMB se consideró como aquella concentración de antimicrobiano a la cual no existe crecimiento bacteriano.

2.9 Determinación de la CMB

Para llevar a cabo este procedimiento se tomaron con una pipeta automática 100 µL de aquellas diluciones de antimicrobianos en las cuales no se observó crecimiento bacteriano a simple vista. Dichas diluciones fueron sembradas en placas de plástico de 150 x 10 mm con agar sangre (previamente rotuladas con el número de dilución y de cepa de *A. madurae*). Se incubaron a 37°C y después de 72 horas se observaron las placas visualmente y se determinó la concentración del antimicrobiano en la escuela no existia crecimiento bacteriano.

2.10 Efecto de la combinación de los antimicrobianos en la CMI

Para llevar a cabo este procedimiento se seleccionaron diferentes antimicrobianos de acuerdo a su diferente mecanismo de acción, por lo que seleccionamos del grupo de

las oxazolidinonas al linezolid y a DA-7864; del grupo de las quinolonas se seleccionó la gatifloxacina, la moxifloxacina y a una nueva quinolona, la garenoxacina. La actividad de estos antimicrobianos fue comparada contra amikacina y SXT (por ser la terapia que se utiliza actualmente en el Servicio de Dermatología del HUJEG). Para realizar este ensayo se utilizó el método del tablero de diluciones cruzadas, el cual consiste en realizar diluciones cruzadas seriadas logarítmicas base 2 de cada uno de los antimicrobianos a partir de su CMI. (Ver sección 2.8.2) (25). Se utilizaron concentraciones de 4 a 5 diluciones abajo del CMI de cada droga y dos diluciones arriba del CMI Las mezclas analizadas fueron “amikacina + linezolid”, “amikacina + SXT”, “amikacina + garenoxacina”, “SXT+ linezolid”, “SXT+ garenoxacina” y “linezolid +garenoxacina”. Con la ayuda de una pipeta automática se colocaron en las filas de las placas de microtitulación 100µL de cada una de las diferentes diluciones del antimicrobiano A, combinadas con 100µL de las diferentes diluciones del antimicrobiano B, dichas diluciones se colocaron de menor a mayor gradiente de concentración. Posteriormente a esta combinación de antimicrobianos se añadieron 10 µL de la suspensión bacteriana ajustada (ver sección 2.8.1) de cada una de las cepas de *A. madurae* seleccionadas, de tal forma que en cada pozo de la placa exista un volumen final de 210 µL formado por 100 µL del antimicrobiano A, 100 µL del antimicrobiano B y 10 µL de la suspensión bacteriana. Asimismo se utilizaron dos hileras de las placas como controles positivo y negativo respectivamente (ver sección 2.8.2), También se agregaron controles del CMI de cada una de las drogas que participaban en la combinación. Las placas ya inoculadas se incubaron a 37°C por 72 horas. Al cabo de este tiempo se determino la CMI de cada una de las drogas mediante inspección visual de cada una de las placas y de acuerdo al

resultado obtenido se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional (CIF) para valorar el efecto de la combinación de drogas (25).

La formula es la siguiente:

$$\text{CIF} = \frac{\text{Droga A}}{\text{CMI de droga A}} + \frac{\text{Droga B}}{\text{CMI de droga B.}}$$

Los resultados se evaluaron de la siguiente manera: CIF= 0.5 = sinergismo, CIF = 0.2 = antagonismo y CIF= 1 = aditivo.

Cabe señalar que del total de las 24 cepas de *A. madurae*, solamente se seleccionaron 10 para esta determinación. Las 10 cepas se seleccionaron de acuerdo a los valores de CMI que presentaron contra el SXT, escogiéndose 5 cepas resistentes y 5 cepas susceptibles al SXT.

2.11 Desarrollo experimental de micetoma por *A. madurae* en ratones BALB/c

Animales:

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 20 a 30 gr. Se formaron 3 grupos de 7 ratones cada uno.

Inóculo:

La preparación del inóculo se llevó a cabo en el LIID, la inoculación y posterior monitoreo de los ratones se realizó en el centro de Investigaciones Biomédicas.

Para inocular a los animales se utilizó una cepa de referencia de *A. madurae* ATCC 19425. A partir de un cultivo joven (7 días) de esta bacteria se preparó una

suspensión bacteriana ajustada (ver sección 2.8.1). Un volumen de 0.1 mL de esta suspensión se sembró en 10 matraces (pyrex y erlen meyer) de 125 mL, los cuales contenían 25 mL de medio líquido de caldo de soya y tripticasa más Twen 80. Dichos matraces se sometieron a agitación, durante 5 días a una temperatura de 37°C hasta obtener suficiente biomasa. Transcurrido este tiempo, se separó la biomasa de cada uno de los matraces, eliminando el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. La biomasa se colocó en tubos cónicos estériles de 50 mL y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó por tres ocasiones con solución salina estéril. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se trituró por 1 minuto, con ayuda de un homogenizador de vidrio para fragmentar la forma filamentosa hasta alcanzar la forma bacilar. Posteriormente la biomasa ya fragmentada se colocó en un tubo cónico de 50 mL (previamente pesado) y nuevamente se centrifugó a 100g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se pesó junto con el tubo para determinar el peso exacto del sedimento, el cual se ajustó con solución salina estéril hasta alcanzar una concentración de 30 mg/50µL. Una vez ajustado, el inóculo se colocó en un vial estéril y se refrigeró a 20°C hasta su utilización (un plazo no mayor de 2 días).

Esquema de inoculación:

Para este ensayo se siguió la técnica para producir micetoma por *N. brasiliensis* descrita anteriormente (26). Se utilizaron 3 grupos de 7 ratones cada uno; antes de ser inoculados a los ratones se les limpió el cojinete plantar utilizando una torunda de alcohol de 70 grados. El primer grupo de ratones fue inoculado en el cojinete plantar derecho con 20 mg (peso húmedo) de la suspensión bacteriana estandarizada (ver sección 2.11), utilizando para ello una jeringa de insulina; el segundo grupo fue inyectado 3 días antes

con ciclofosfamida (200 mg/kg peso del ratón) por vía intraperitoneal y posteriormente fue inoculado en el cojinete plantar con la misma cantidad de bacteria que el grupo anterior; un tercer grupo se utilizó como control negativo de infección, al cual se le inyectó únicamente 50 μ L de solución salina en el cojinete plantar. Inmediatamente después de la inoculación se registró la dimensión de la pata inoculada utilizando un vernier, esto para evaluar la evolución del micetoma de acuerdo al grado de inflamación, se registraron las medidas durante 7 semanas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Evaluación del crecimiento de *A. madurae*

Se realizó el cultivo de las 24 cepas de *A. madurae* en placas de agar sangre con la finalidad de evaluar su morfología. Los resultados se observan en las figuras 2 y 3.



Figura 2 Cultivo de *A. madurae* ATCC 19425 en placas de agar sangre



Figura 3 Cultivo de *A. madurae* INDRE 4726 en placas de agar sangre

Así mismo se realizaron pruebas de hidrólisis de caseína y hemólisis sobre las 24 cepas de *A. madurae*. En las figuras 4 y 5 se muestran los resultados de los diferentes cultivos.

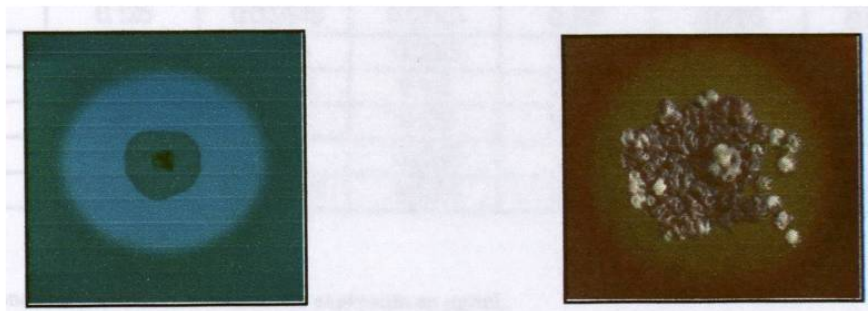


Figura 4 Prueba de hidrólisis de caseína sobre *A. madurae*

Figura 5 Prueba de hemólisis sobre *A. madurae*

3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *A. madurae* contra los diversos antimicrobianos

Se evaluaron un total de 24 cepas de *A. madurae* aisladas de micetoma contra los diversos antimicrobianos. En la tabla I se incluye un resumen de los valores de CMI hechos por duplicado de todas las cepas de *A. madurae* contra diversos antimicrobianos.

Tabla 1 Valores de CMI de *A. madurae* contra los diversos antimicrobianos.

No. de Cepa (INDRE)	ANTIMICROBIANOS						
	Moxifloxacina	Garenoxacina	Gatifloxacina	Linezolid	DA-7867	Amikacina	SXT
4702	0.0625	0.03125	0.01562	0.0625	0.0625	0.125	152/8
4703	0.25	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.25	19/1
4704	0.125	0.5	0.01562	0.125	0.0625	2	9.5/0.5
4709	0.5	0.01562	0.125	0.25	0.0625	0.125	19/1
4711	0.125	0.007815	0.03125	0.125	0.0625	1	38/2
4713	0.125	0.0625	0.03125	0.125	0.01562	0.125	19/1
4716	0.125	0.25	0.0625	0.125	0.125	0.5	38/2
4719	0.5	0.03125	0.125	0.25	0.01562	0.125	9.5/0.5
4720	0.5	0.25	0.25	0.125	0.0625	0.25	38/2
4721	0.5	0.03125	0.125	0.125	0.03125	0.125	38/2
4722	0.125	0.5	0.03125	0.125	0.03125	0.0625	9.5/0.5
4724	1	0.25	0.25	0.0625	0.0625	0.125	38/2
4725	1	0.0625	0.125	0.125	0.0625	0.0625	19/1
4726	0.5	0.0625	0.125	0.125	0.0625	0.0625	38/2
4728	0.25	0.125	0.0025	0.125	0.0625	0.125	38/2
4729	1	0.25	0.25	0.25	0.0625	0.5	38/2
4730	0.125	0.0625	0.03125	0.25	0.0625	0.125	9.5/0.5
4731	0.125	0.03125	0.03125	0.03125	0.0625	0.125	76/4
4738	0.125	0.007815	0.03125	0.125	0.0625	0.03125	9.5/0.5
4740	0.25	0.0625	0.0025	0.25	0.0625	0.0625	38/2
4742	0.5	0.01562	0.125	0.125	0.0625	0.0625	76/4
4745	0.5	0.125	0.125	0.125	0.125	0.03125	38/2
4762	0.25	0.125	0.0625	0.25	0.125	2	19/1
4764	0.25	0.0039707	0.0625	0.125	0.0625	0.125	19/1

CMI: concentración mínima inhibitoria expresada en µg/mL.

En la tabla II y III se muestran los rangos, CMI₅₀ y CMI₉₀ de cada uno de los antimicrobianos contra *A. madurae*. Considerando el punto de corte utilizado para *Nocardia spp*, de <8 µg/mL, todas las cepas de *A. madurae* fueron susceptibles a amikacina; Para el SXT la mayoría de las cepas (87.5%) mostraron valores de CMI alrededor de 32 µg/mL, el cual es el punto de corte utilizado para determinar la susceptibilidad de *Nocardia spp*. (27).

Las drogas, gatifloxacina, moxifloxacina, garenoxacina, linezolid y DA-7867 exhibieron excelente actividad contra *A. madurae*, con un valor máximo de CMI igual a 1 µg/mL. DA-7867 presenta los valores más bajos de CMI, con un CMI₅₀ de 0.0625 y CMI₉₀ de 0.125 µg/mL.

Tabla II Valores de CMI de los antimicrobianos contra *A. madurae*

Antimicrobiano	CMI (µ/mL) ^a		
	Rango	50%	90%
Amikacina	0.03125-2	0.125	1
SXT	9.5/0.5-152/8	38/2	76/4
Linezolid	0.03125-0.25	0.125	0.25
DA-7867	0.01562-0.125	0.0625	0.125
Gatifloxacina	0.01562-0.25	0.0625	0.25
Moxifloxacina	0.0625-1	0.25	1
Garenoxacina	0.0039707-0.5	0.0625	0.25

^a CMI₅₀: Concentración mínima inhibitoria que inhibe el 50% de cepas de *A. madurae*.

CMI₉₀: Concentración mínima inhibitoria que inhibe el 90% de cepas de *A. madurae*

Los resultados obtenidos fueron confirmados utilizando a *N. asteroides* ATCC 19247 y *A. madurae* ATCC19425, como cepas control. Los resultados se muestran en la tabla III.

Tabla III Actividad de los diversos antimicrobianos contra las cepas control

Cepas control	CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
	Amikacina	SXT	Linezolid	DA-7867	Gatifloxacina	Moxifloxacina	Garenoxacina
<i>N. asteroides</i> ATCC 19247	0.125	2.3/0.125	0.125	<0.03	1	1	0.5
<i>A. madurae</i> ATCC 19425	0.0625	9.5/0.5	0.125	0.03	0.03	0.125	0.015

Como controles de ensayo de susceptibilidad se utilizaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Los resultados se observan en la siguiente tabla.

Tabla IV Concentración mínima inhibitoria de cepas control

Cepas control	CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
	Amikacina	Garenoxacina	Gatifloxacina	Moxifloxacina	SXT	Linezolid	DA-7867
<i>E. coli</i>	4	0.00781	0.0625	0.0625	4.75/0.25		
<i>S. aureus</i>	2	0.00781	0.125	0.0625	152/8	1	0.0039

3.3 Comparación del efecto de las quinolonas (gatifloxacina, moxifloxacina y garenoxacina) contra amikacina sobre *A. madurae*.

En la figura 6 se muestra el efecto de las quinolonas comparado con amikacina sobre *A. madurae*. Como se observa en la figura, no existe una notable diferencia entre los valores de CMI de cada una de estas drogas. La gatifloxacina es el antimicrobiano que presenta los valores más bajos de CMI de las quinolonas, al inhibir al 100% de las cepas

de *A. madurae* con una concentración de 0.25 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo la amikacina es el antimicrobiano que presentó los valores mas altos de CMI en comparación con las quinolonas, ya que se requirió de una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ para inhibir a todas las cepas de *A. madurae*.

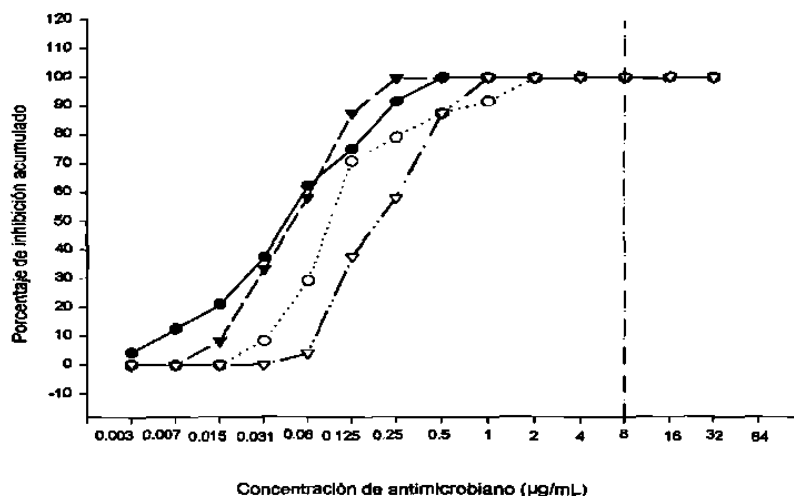


Figura 6 Comparación de la sensibilidad de las quinolonas contra amikacina sobre *A. madurae*. En la grafica se observa el porcentaje de inhibición acumulativo de *A. madurae* contra la concentración de los diversos antimicrobianos, amikacina (o), moxifloxacina (∇), gatifloxacina (\blacktriangledown) y garenoxacina (\bullet). La línea vertical punteada representa el punto de corte usado para determinar la susceptibilidad para amikacina de *Nocardia spp.*(13).

3.4 Comparación del efecto de las oxazolidinonas (linezolid, y DA-7867) contra amikacina sobre *A. madurae*

Se evaluó el efecto de las oxazolidinonas en comparación con amikacina sobre *A. madurae*, los resultados se observan en la figura 7. Igual que en el caso de las quinolonas

no se aprecia una notable diferencia entre el efecto de estos antimicrobianos. La droga que presenta los valores más bajos de CMI es DA-7867 ya que con concentración de 0.125 $\mu\text{g/mL}$ inhibe al 100% de las cepas de *A. madurae*. De igual manera que en el caso de las quinolonas, la amikacina presenta los valores más altos de CMI contra esta bacteria.

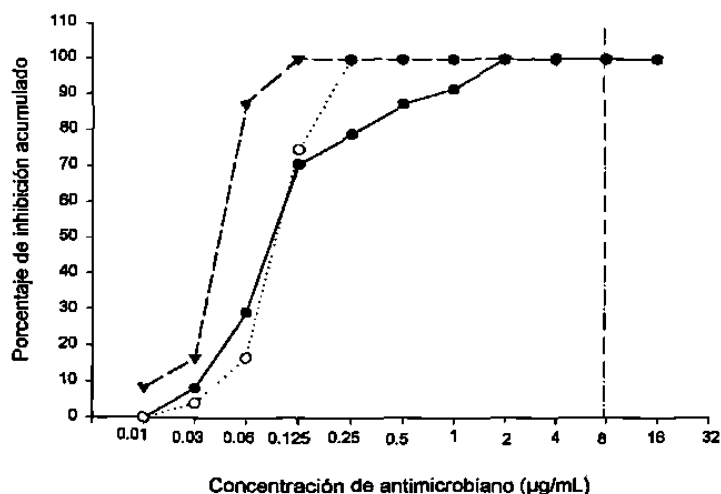


Figura 7 Comparación de la sensibilidad de las oxazolidinonas contra amikacina sobre *A. madurae*. En la gráfica se observa el porcentaje de inhibición acumulada de *A. madurae* contra la concentración de los diversos antimicrobianos, amikacina (\bullet), linezolid (\circ), y DA-7867 (\blacktriangledown). La línea vertical punteada representa el punto de corte utilizado para determinar la susceptibilidad para amikacina en el caso de *Nocardia spp*

3.5 Comparación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de las quinolonas contra amikacina sobre *A. madurae*

Se llevó a cabo la comparación entre el efecto del CMI y el efecto del CMB de las quinolonas contra amikacina sobre *A. madurae*, dicha comparación se muestra en las figuras 8, 9, 10 y 11. Como puede observarse, existe una mínima diferencia entre el efecto de la CMI y el efecto de la CMB de estos antimicrobianos sobre *A. madurae*, tanto de gatifloxacina, moxifloxacina y garenoxacina, como en el caso de amikacina. Los valores del CMI están muy cercanos a los valores del CMB de cada uno de estos antimicrobianos, lo que nos indica de alguna manera un posible efecto bactericida que presentan estas drogas sobre dicha bacteria.

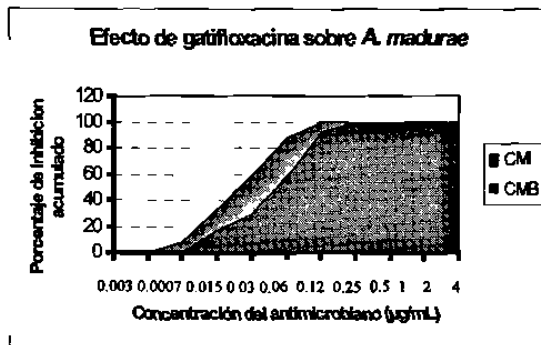


Figura 8 Efecto de gatifloxacina sobre *A. madurae*

CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

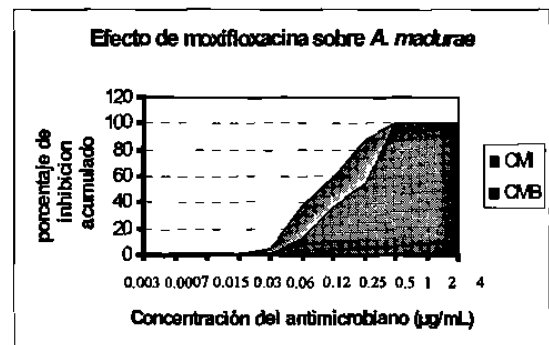


Figura 9 Efecto de moxifloxacina sobre *A. madurae*

CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

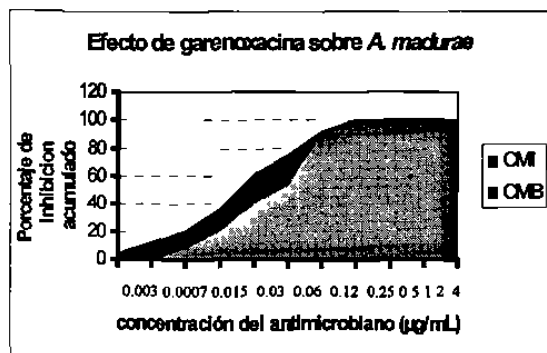


Figura 10 Efecto de garenoxacina sobre *A. madurae*

CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

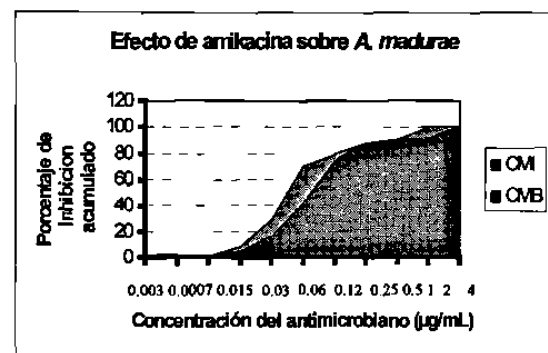


Figura 11 Efecto de amikacina sobre *A. madurae*

CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

3.6 Comparación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de las oxazolidinonas contra amikacina sobre *A. madurae*.

En las figuras 12, 13 y 14 se observa la comparación entre el efecto del CMI y el efecto del CMB de las oxazolidinonas en comparación con amikacina sobre *A. madurae*. Como se muestra en las figuras, no se aprecia una notable diferencia entre el efecto de la CMI y el efecto de la CMB de cada una de estas drogas. Igual que en el caso de las quinolonas la diferencia entre estos 2 efectos es mínima a razón de 1 a 2 concentraciones respectivamente, indicando de esta manera el efecto bactericida de estos antimicrobianos sobre *A. madurae*.

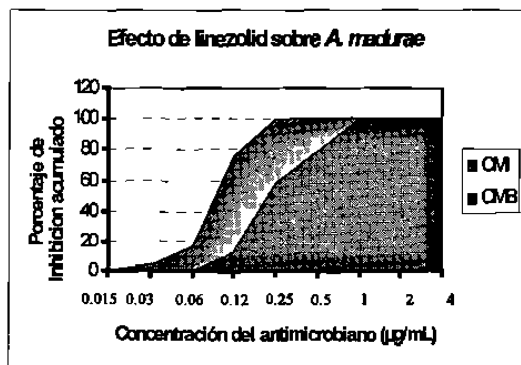


Figura 12 Efecto de linezolid sobre *A. madurae*
CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

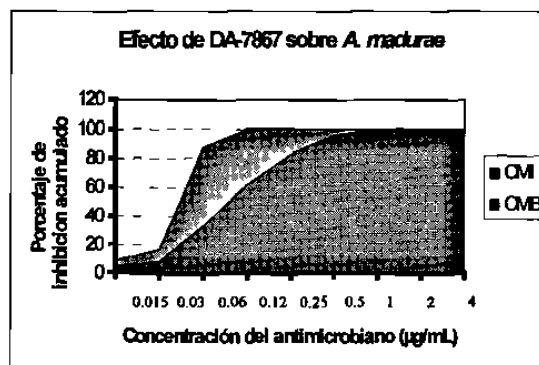


Figura 13 Efecto de DA-7867 sobre *A. madurae*
CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

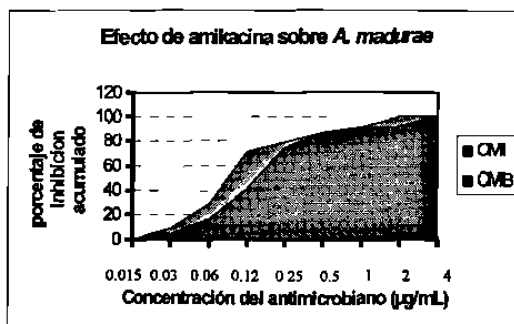


Figura 14 Efecto de amikacina sobre *A. madurae*
CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

3.7 Comparación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del SXT sobre *A. madurae*

En la figura 15 se muestra la comparación entre la CMI y CMB del SXT sobre *A. madurae*. Como se puede apreciar en la figura existe una notable diferencia entre el efecto de la CMI y el efecto de la CMB del SXT sobre *A. madurae*, lo que nos indica que este antimicrobiano presenta una actividad bacteriostática sobre las cepas de *A. madurae*, a diferencia de las otras drogas cuyo efecto sobre esta bacteria parece ser bactericida.

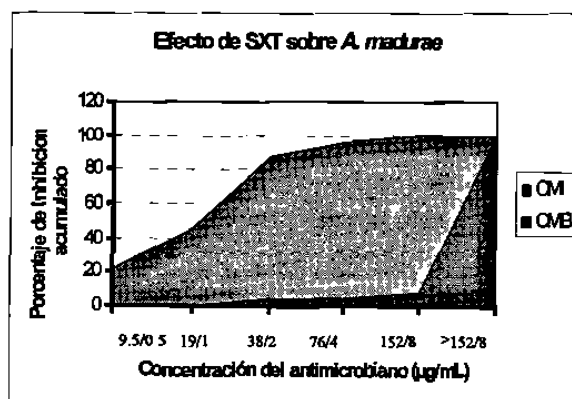


Figura 15 Efecto de SXT sobre *A. madurae*

CMI: Concentración mínima inhibitoria
CMB: Concentración mínima bactericida

3.8 Efecto de la combinación de los diferentes antimicrobianos en el CMI sobre *A. madurae*

Para realizar este ensayo se seleccionaron 4 de los 7 antimicrobianos utilizados para este estudio, estos antimicrobianos fueron: amikacina, SXT, linezolid y garenoxacina. De igual manera se eligieron para este ensayo, 10 de las 24 cepas de *A.*

madurae. Esta selección se llevó a cabo tomando en cuenta los diferentes valores de CMI que presentaron estas cepas contra el SXT, escogiéndose 5 cepas resistentes y 5 cepas sensibles al SXT. (Ver sección 2.10).

En la tabla V se muestra el efecto de la combinación de los antimicrobianos en el CMI. Como se puede observar en la tabla V, se presentó poco efecto sinérgico en las diferentes combinaciones de antimicrobianos realizadas, destaca solamente el efecto sinérgico que se observó en una de las combinaciones de SXT con amikacina. De igual manera no se presentó ningún efecto antagónico entre estas drogas. El efecto aditivo es el que se observó en la mayoría de las combinaciones realizadas.

Tabla V Efecto de la combinación de los antimicrobianos en el CMI

Combinación		Efecto		
Antimicrobiano	Sinergismo	Antagonismo	Adición	
Amikacina/ SXT	1/9	0/9	8/9	
Amikacina/Linezolid	0/9	0/9	9/9	
Amikacina/BMS-284756	0/8	0/8	8/8	
SXT/BMS-284756	0/9	0/9	9/9	
SXT/Linezolid	0/10	0/10	10/10	
Linezolid/BMS-284756	0/10	0/10	10/10	

3.9 Desarrollo experimental del micetoma en ratones BALB/c

En la figura 16 se muestra el desarrollo del micetoma en ratones BALB/c. Como se puede apreciar el grupo 1 (ratones inyectados previamente con ciclofosfamida) es el

que presentó la mayor inflamación (5 mm) del cojinete plantar, la cual fue disminuyendo gradualmente hasta desaparecer en la cuarta semana post-inoculación. De igual manera el grupo 2 (ratones inoculados con *A. madurae* solamente), presentó una inflamación en el cojinete plantar de un diámetro de 2.5 mm, disminuyendo gradualmente hasta desaparecer. Por otro lado en el grupo 3 (grupo control, inyectado con solución salina) no se observó inflamación del cojinete plantar, evaluando de esta manera el desarrollo adecuado del experimento. Como podemos observar no se pudo desarrollar el micetoma bajo estas condiciones experimentales.

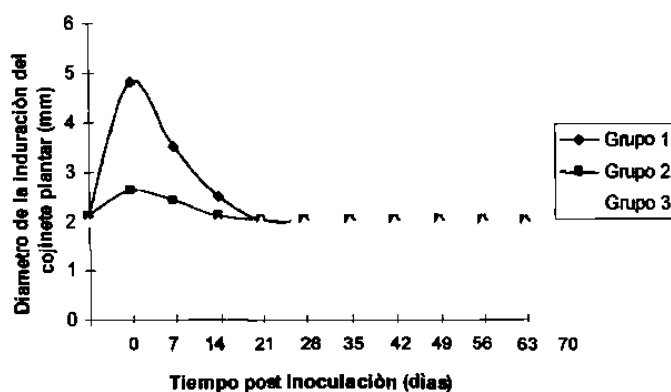


Figura 16 Desarrollo experimental del micetoma en ratones BALB/c. Grupo de ratones: Grupo 1 (◆): grupo inyectado previamente con ciclofosfamida mas *A. madurae*, Grupo 2 (■): grupo inyectado con *A. madurae* solamente, Grupo 3 (▲): grupo control, inyectado con solución salina.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El tratamiento convencional para el micetoma causado por *A. madurae* es a base de la combinación del SXT y amikacina, sin embargo este esquema tiene desventajas ya que solo se observa una cura del 95 % de los casos, además de la intolerancia que presentan algunos pacientes a estos medicamentos, debido a esto es necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento contra esta enfermedad (3).

En 1976, Carrols y cols. reportaron un estudio de susceptibilidad de 17 antimicrobianos por el método de dilución en placas de agar, en 6 cepas de *Actinomadura*, de las cuales 3 cepas eran de la especie *A. madurae*. Las cepas pertenecientes a esta especie mostraron sensibilidad a SXT (2/3), sulfisoxazol (1/3), doxiciclina (1/3), minociclina (1/3), viomicina (3/3), gentamicina (3/3), capreomicina (2/3), ampicilina (1/3), kanamicina (2/3), tetraciclina (1/3), clíndamicina (2/3), eritromicina (2/3) y lincomicina (1/3). Dichas cepas mostraron resistencia solamente a la rifampicina (0/3). En este trabajo emplearon el método de dilución en placas de agar para determinar la susceptibilidad de *A. madurae*. Dicho método consiste en añadir cada una de las diferentes diluciones de los antimicrobianos a probar, en placas de agar y posteriormente se inoculan con las cepas de *A. madurae*. Las placas se incuban y posteriormente se lleva a cabo la lectura de las mismas. Sin embargo cabe mencionar que este método es cualitativo y sus criterios para determinar la susceptibilidad o resistencia de cada cepa se basan en el número de colonias presentes en cada una de las diluciones

de antimicrobianos utilizadas en las placas de agar. El inconveniente de este método es que no permite determinar exactamente el CMI de cada uno de los diferentes antimicrobianos probados contra *A. madurae* (8).

A diferencia del método utilizado por Carrols y cols en el presente trabajo se empleo el método de dilución en caldo, el cual es un método cuantitativo que nos permite determinar exactamente la CMI de cada uno de los antimicrobianos evaluados contra *A. madurae*.

De igual manera ellos reportan haber utilizado en este estudio, 3 cepas de *A. madurae* contra 17 antimicrobianos, de los cuales ninguno es de reciente desarrollo y la mayoría presentan importantes efectos colaterales como anemia, agranulocitosis, metaheoglobulinemia, etc., en el caso de las sulfas y nefrotoxicidad y hepatotoxicidad en el caso de las tetraciclinas (10, 11).

En 1990, Mc Neil y cols. reportaron un estudio de susceptibilidad de *A. madurae* frente a 14 antimicrobianos, utilizando el método de microdilución en caldo. Ellos observaron en este trabajo que *A. madurae* es sensible a la amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, doxiciclina, eritromicina, imipinem, minociclina, sulfametoxazol, SXT y amikacina (9). En este estudio se utilizaron 42 cepas de *A. madurae*, de las cuales 13 fueron aisladas de micetoma, 24 de esputo, 2 de cerebro y sangre respectivamente y el resto es de origen desconocido. En el presente estudio las 24 cepas fueron aisladas de micetoma.

A diferencia del trabajo de Mc Neil y cols, en el presente trabajo se seleccionaron antimicrobianos de reciente desarrollo, algunos de los cuales presentan un mecanismo de acción diferente que les permite tener un mayor espectro de actividad contra diversos

organismos, tanto bacterias gram positivas, gram negativas como organismos atípicos. Destacando su actividad contra bacterias relacionadas con *A. madurae*, como lo son, *Corynebacterium jeikeium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *N. brasiliensis*, bacterias relacionadas con *A. madurae* (11, 12). De igual manera estos nuevos antimicrobianos presentan menos efectos colaterales comparado con las tetraciclinas, aminoglucósidos y las sulfas (16, 17).

En el 2004, Vera-Cabrera y cols. reportaron la actividad *in vitro* de diversos antimicrobianos de reciente desarrollo contra *N. brasiliensis*, utilizando el método de microdilución en caldo. En este trabajo ellos reportaron que *N. brasiliensis* es susceptible a la gatifloxacina, la moxifloxacina, la garenoxacina y el DA- 7867 (19). En el presente estudio observamos que *A. madurae* es susceptible a los mismos antimicrobianos probados por Vera-Cabrera, solo que esta ultima presenta valores mas bajos de CMI que *N. brasiliensis*, por lo tanto dichos antimicrobianos presentan una mayor actividad contra *A. madurae*. El antimicrobiano DA-7867 presenta una excelente actividad contra *N. brasiliensis*, dicho efecto también se observó en *A. madurae*. Se ha demostrado que el DA-7867 presenta una mayor actividad que el linezolid contra organismos gram positivos (23), incluyendo a *N. brasiliensis*. En el presente trabajo no se observó dicha diferencia entre la actividad de estas oxazolidinonas contra *A. madurae*.

En el 2002, Gómez Flores A. y cols. reportaron la actividad *in vitro* e *in vivo* de diversos antimicrobianos (amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ceftriaxona, gentamicina, isepamicina, minociclina, netilmicina, nitrozolina, espiramicina y SXT) contra *N. brasiliensis*, utilizando el metodo de microdilución en caldo (28). Comparando el trabajo de Gómez Flores y cols con el presente estudio se observa que la actividad *in*

vitro de dichas drogas contra *N. brasiliensis* es similar a la actividad *in vitro* contra *A. madurae*. Ellos reportan el uso del linezolid y la amikacina contra *N. brasiliensis* en un modelo murino, encontrando que la formación de lesiones producida por esta bacteria disminuyen al administrar esta droga. De igual manera *A. madurae* muestra susceptibilidad *in vitro* al linezolid, semejante a *N. brasiliensis*, por lo que podríamos inferir los resultados, sin embargo es necesario evaluar dicha actividad observada *in vitro* en un modelo experimental *in vivo* con el objetivo de demostrar la utilidad del linezolid o cualquiera de otros antimicrobianos, en la terapia del micetoma por *A. madurae* (28).

Algunos microorganismos desarrollan resistencia a ciertos antimicrobianos, lo cual es de gran importancia en el tratamiento de una enfermedad, pues las drogas originalmente muy eficaces para el control de una enfermedad bacteriana se tornan menos eficaces (o ineficaces) cuando aparecen mutantes resistentes a dichos antimicrobianos, es por ello que en este trabajo se evaluó la combinación de diversos antimicrobianos con la finalidad de determinar un posible efecto sinérgico entre estos (12). En la literatura no existen reportes de combinaciones de antimicrobianos realizadas contra *A. madurae*. En la terapia contra el actinomicetoma, la combinación de SXT y amikacina ha dado muy buenos resultados, obteniendo una cura alrededor del 95% de los casos, debido al efecto sinérgico que existe entre estos antimicrobianos (3). Sin embargo este efecto solo se observó en 1/9 de las combinaciones de SXT y amikacina, un efecto aditivo fue el que se observó en la mayoría de las combinaciones realizadas, por lo tanto no existe una interacción significativa entre estos antimicrobianos.

Entre los modelos experimentales de micetoma en ratones por *A. madurae* destacan los trabajos realizados por Rippon, J.W. y cols (1967), los cuales lograron

desarrollar el micetoma en ratones, utilizando para ello ratones de las cepas Swiss albino y C-57, los cuales fueron inoculados en la ingle con una cepa *A. madurae*, aislada de micetoma humano (29). A diferencia de este trabajo en el presente estudio se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, los cuales se inocularon en el cojinete plantar con *A. madurae*. De igual manera se utilizó una cepa de *A. madurae* diferente en ambos casos, ya que la cepa utilizada por Rippon, J.W. y cols, no fue una cepa de referencia (*A. madurae* ATCC 19425), como la que se utilizó en el presente estudio. Como observamos las diferencias radican en el tipo de cepa de ratón, cepa de *A. madurae*, así como la vía de inoculación, la cual difícilmente es compatible con la vía de infección natural (29).

Otro de los modelos reportados para producir micetoma por *A. madurae* es el de Palma R. y cols (2002), utilizando para ello *A. madurae* GI-API (Grupo internacional de Investigación de Actinomicetos Patógenos) y la cepa de referencia ATCC 19245, en ratones de las cepas CFW, CD1 y BALB/c. Ellos reportaron que en ninguna de las diferentes cepas de ratones utilizadas se observó la formación de micetoma, solamente en la cepa de ratón BALB/c, se observó una infección provocada por *A. madurae* ATCC 19425. Dicha infección se manifestó como una pequeña inflamación en el cojinete plantar que desapareció gradualmente en el transcurso de las 2 semanas siguientes. Palma R. y cols sugieren que probablemente *A. madurae* induzca algún mecanismo de tipo anérgico en el huésped infectado (30).

En el ensayo *in vivo* del presente trabajo se utilizaron condiciones experimentales similares a las del trabajo de Palma R. y cols, se utilizó la misma cepa de ratón (BALB/c), así como la misma cepa de referencia, *A. madurae* ATCC 19425, de igual

manera en los resultados obtenidos del presente estudio se observa un comportamiento similar a lo reportado por Palma R. Y cols.

Cabe señalar que al no contar con un modelo experimental *in vivo* para desarrollar el micetoma por *A. madurae* se siguió el modelo experimental establecido para *N. brasiliensis*, el cual ha obtenido muy buenos resultados (26). Sin embargo las condiciones establecidas en este modelo de *N. brasiliensis* no se pudieron establecer para *A. madurae* impidiendo de esta manera el desarrollo del modelo *in vivo*, por lo que la actividad de los diversos antimicrobianos no pudo ser evaluada. Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que *A. madurae* presenta una excelente sensibilidad a la mayoría de los antimicrobianos estudiados, por lo que el siguiente objetivo sería utilizar diferentes condiciones experimentales para desarrollar el modelo *in vivo* y poder evaluar la actividad que presentó *A. madurae in vitro*.

Como mencionamos anteriormente es necesario evaluar otras condiciones en el modelo experimental con la finalidad de poder en algún momento establecer el modelo *in vivo*. En nuestro modelo, se utilizó una sola dosis de inóculo, la cual podría haber resultado insuficiente para desarrollar la infección; por lo que se podría utilizar una dosis más alta o varias dosis aplicadas en diferentes tiempos, asimismo se podría suprimir aun más el sistema inmune, con la finalidad de establecer mejores condiciones para que esta bacteria se establezca por más tiempo y no sea eliminada rápidamente, si acaso esto sucedió, de igual manera se podría utilizar otra cepa de *A. madurae* aislada directamente de micetoma, inclusive se podría cambiar el modelo animal, utilizando cobayos u otro animal adecuado para desarrollar esta infección, Este estudio da la pauta para que en ensayos posteriores se evalúen nuevas condiciones experimentales para desarrollar el

modelo *in vivo* y de esta manera poder evaluar la efectividad de los antimicrobianos ensayos *in vitro*, estableciendo de alguna manera un tratamiento contra la infección por *A. madurae*.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones experimentales realizadas *in vitro*, se estableció que todas las cepas evaluadas de *A. madurae* son susceptibles a la moxifloxacina, la amikacina, la gatifloxacina, el linezolid, el DA-7867 y la garenoxacina.
- La mayoría de las cepas evaluadas de *A. madurae* son susceptibles al trimetoprim-sulfametoxazol.
- La gatifloxacina, la moxifloxacina, el linezolid, el DA-7867 y la garenoxacina, presentaron una mayor actividad *in vitro* en comparación con la amikacina y el trimetoprim-sulfametoxazol.
- Las combinaciones entre los diferentes antimicrobianos estudiados presentaron poco efecto sinérgico, el efecto aditivo fue el que se observó en mayor proporción.
- La efectividad de los antimicrobianos *in vivo*, no pudo ser evaluada, debido a que no se logró establecer el modelo murino en las condiciones experimentales utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **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.
2. **Bonifaz.A.** Micología medica básica. México. Primera edición. Ed. C. Fco Méndez Cervantes. 1990. Pp 135-161.
3. **Welsh, O.** 1991. Mycetoma: concurrent concepts in treatment. *Int. J. Dermatol* 30:387-398.
4. **Dr. Pedro Lavalle Aguilar, Dra. María del Carmen Padilla Desgarenes, Dr. Javier Pérez Gutiérrez, Dra. Ivette Rivera, Biol. Samuel Reynoso Rangel.** 2000. Micetomas por *Actinomadura madurae* en México. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 9(1):19-25.
5. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap14>
6. **Holt G.J., Krieg R.N., Sneath P.H., Staley J.T., Williams S.T.** Bergey's manual of determinative bacteriology. USA. Novena edición. Ed. Williams& Wilkins.1994. pp 679-684.
7. **Topley & Wilsons.** Microbiology and Microbial Infections Vol.2. USA. Novena edición, Ed. Arnold .pp 473-478.
8. **Gary F.,Carrol. M.D. June M. Brown, B.S., and Leanor D. Haley PhD .1976.** A method for determining in vitro-drug susceptibilities of some *Nocardie* and *Actinomadurae*. *Center for Disease Control.*68(2): 279-283.
9. **Mc Neil, M.M., J. Brown, W.R. Jarvis, and L. Allejo.** 1990. Comparison of species distribution antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. *Rev. Infect. Dis.* 12: 778-783.
10. **Goodman&Gilman.** Las bases farmacológicas de la terapéutica México. Sexta edición Ed. Medica Panamericana. 1982. pp.1140-1153.
11. <http://www.iqb.es/cbasicas/Farma/farma04/A043.htm>.
12. **Madigan M. T.,Martinko J. Parker J.** Biología de los microorganismos . México. Octava edición. Ed. Prentice Hall,pp 736-737.

13. <http://www.cebac.com.ar/grogasamikacina.htm>
14. **Welsh, O., E. Saucedo, J. González, and J. Ocampo.** 1987. Amikacina alone and in combination with trimetoprim-sulfamethoxazole in the treatment of actinomycotic mycetoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17: 443-448.
15. **Murray R.P., Baron J.E., Pfaller A.M., Tenover C.F., Tenover H.R.** Manual of clinical microbiology. Washington D.C. Séptima edición. Ed. Asm Press. 1999. pp374-376.
16. **Garza-Rodríguez J.A y Gutiérrez Zufiaurre N.** 2002. Desfluoroquinolonas frente a flouroquinolonas. *Rev Esp Quimioterap.* 15(4): 303-305.
17. <http://www.biomed.uninet.edu>
18. <http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/qtfba/quino/quinolonas.htm>
19. **Vera-Cabrera, L., A. Gómez-Flores, W.G. Escalante-Fuentes, and O. Welsh.** 2001. In vitro activity of PNU-100766 (linezolid), a new oxazolidinone antimicrobial against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 45: 3629-3630.
20. **Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC.** 2003. Postantibiotic effects of garenoxacina (BMS-284756) against 12 gram-positive or negative organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(3): 1140-1142.
21. **Waites KB, Carbb DM, Bing X, Duffy LB.** 2003. In vitro susceptibilities to and bactericidal activities of garenoxacina (BMS-284756) and other antimicrobial agents human mycoplasmas and ureaplasmas. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(1): 161-165.
22. http://www.drwebsa.com.ar/smiba/med_interna/vol_02/04_06.htm
23. **T.H. LEE, D.H. KIM, J.H. CHOI, S.H. W.B. IM, J.K RHEE.** 2003. In vivo efficacy of DA-7867, a new oxazolidinone in murine systemic and local infection. 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
24. **W.B.IM.S.H.CHOI, T.H.LEE, J.H. CHO, and J.K.RHEE.** 2003. In vitro and in vivo studies of hetero-ring substituted pyride containing oxazolidinone derivates, including DA-7867. 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
25. **Lorian Victor M.D.,** Antibiotics in laboratory medicine. New York. Primera edición. Ed. Williams&Wilkins. 1996.pp330-338.

26. **L.Vera Cabrera, M.A. Rodríguez-Quintanilla, P. Boiron, M.C. Salinas-Carmona, O. Welsh.** 1998. Experimental mycetoma by *Nocardia brasiliensis* in rats. *J Mycol Med.* 8: 183-187.
27. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacterial that grow aerobically. Approved standard. Document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
28. **Alejandra Gómez-Flores, Oliverio Welsh Salvador Said Fernández, Gerardo Lozano-Garza, Roman Erick Tavarez-Alejandro y Lucio Vera Cabrera.** 2004. In Vitro and In Vivo Activities of Antimicrobial against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy.* 48 (3): 832-837.
29. **Rippon, PhD and Gary L. Peck, M.D. John W.** 1967. Experimental Infection With *Streptomyces madurae* as a fuction of collagenase The journal of investigative dermatology.49(4): 371-378.
30. **Palma RA, Castrillon RLE, Elija SJJ, Padilla DC IJV.** 2000. Infección experimental por *Actinomadura madurae* en ratón. *Rev Cent Dermatol Pascua.* 9(2): 96-101.

APÉNDICE A

LISTA DE CEPAS DE *Actinomadura madurae*

NUMERO DE CEPA	PROCEDENCIA
4702	ISET
4703	ISET
4704	ISET
4709	DU-1078
4711	DU
4713	IOC-4127
4716	ISET
4719	CALIFORNIA, GATO
4720	DU-4127
4721	IHM-4128
4722	IHM-71
4724	RU-863
4725	RU-948
4726	RU-959
4728	ISET
4729	RU-950
4730	RU-953
4731	RU-1136
4738	ISET
4740	ISET
4742	ISET
4745	ISET
4762	HONDURAS-927
4764	INDRE

ISET: Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales

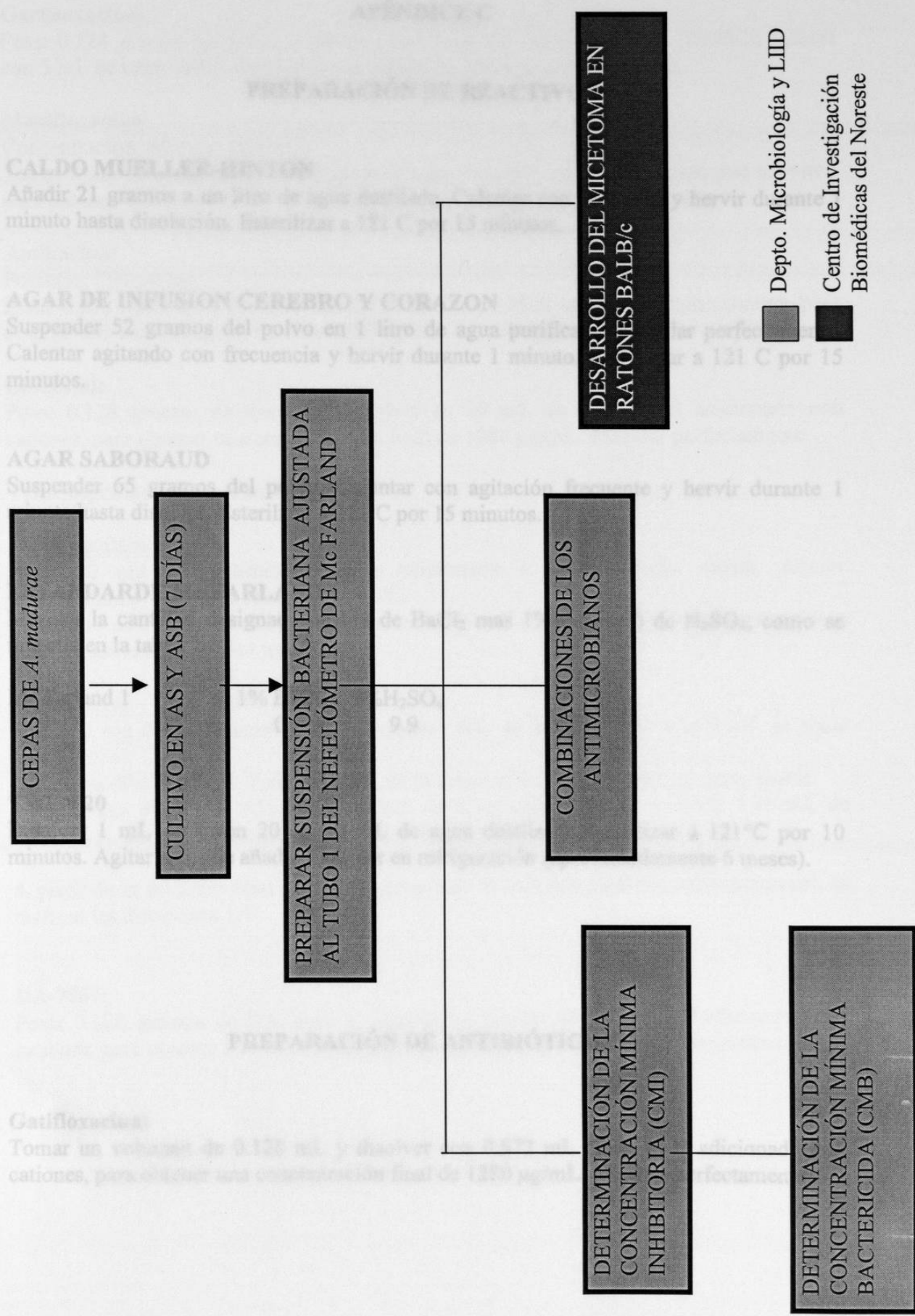
DU: Duke University, Durham, N.C., USA

RU: Rutgers University, New Brunswick, N.J., USA

IHM: Instituto de Higiene de Montevideo, Uruguay

IOC: Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

APENDICE B ESTRATEGIA GENERAL



Estrategia general del presente trabajo. Los recuadros con relleno claro indican los análisis que fueron realizados en el LIID del HUIJEG y en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL, y el recuadro de color oscuro pertenece a los trabajos realizados en el Centro de Investigaciones y Bioterio del Noreste. AS, agar sangre de camero, ASB, agar dextrosa saboraud

APÉNDICE C

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

CALDO MUELLER-HINTON

Añadir 21 gramos a un litro de agua destilada. Calentar con agitación y hervir durante 1 minuto hasta disolución. Esterilizar a 121 C por 15 minutos.

AGAR DE INFUSION CEREBRO Y CORAZON

Suspender 52 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar perfectamente. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 C por 15 minutos.

AGAR SABORAUD

Suspender 65 gramos del polvo. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolver. Esterilizar a 121 C por 15 minutos.

ESTANDARDE Mc FARLAND 1

Mezclar la cantidad designada de 1% de BaCl₂ mas 1% (vol/vol) de H₂SO₄, como se muestra en la tabla.

Mc Farland 1	1% BaCl ₂	1% H ₂ SO ₄
1	0.1	9.9

TWEN 20

Disolver 1 mL de Twen 20 en 50 mL de agua destilada. Esterilizar a 121°C por 10 minutos. Agitar antes de añadir. Guardar en refrigeración (aproximadamente 6 meses).

PREPARACIÓN DE ANTIBIÓTICOS:

Gatifloxacina:

Tomar un volumen de 0.128 mL y disolver con 0.872 mL caldo M-H adicionado con cationes, para obtener una concentración final de 1280 µg/mL. Mezclar perfectamente.

Garenoxacina:

Pesar 0.128 gramos del polvo y disolver con 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Aforar con 5 mL de caldo M-H adicionado con cationes. Mezclar perfectamente.

Moxifloxacina:

Concentración: 400 mg/ 250mL

Tomar 4 mL de moxifloxacina y adicionar 1 mL de caldo M-H, adicionado con cationes, para obtener una concentración final de 1280 µg/mL. Mezclar perfectamente.

Amikacina:

Potencia: 706 µg/mg

Pesar 0.0181 gramos y disolver con 10 mL de caldo M-H adicionado con cationes, para obtener una concentración final de 1280 µg/mL. Mezclar perfectamente.

Linezolid:

Pesar 0.128 gramos de linezolid. Disolver en 10 mL de caldo M-H adicionado con cationes, para obtener una concentración final de 1280 µg/mL. Mezclar perfectamente.

Trimetoprim-sulfametoxazol:**Sulfametoxazol:**

Pesar 10 mg del antimicrobiano y adicionarle 1 mL de agua estéril. Añadir posteriormente 1 gota de NaOH 2.5 mol/L.

Tomar de esta solución 304 µL y añadir 9.696 mL de caldo M-H, para obtener una concentración final de 304 µg/mL.

Trimetoprim:

Pesar 10 mg del antimicrobiano y adicionar 1 mL de ácido láctico más 9 mL de agua estéril.

Hacer una dilución 1:10. Tomar 100 µL de la solución y adicionar 900 µL agua estéril.

Realizar una dilución 1:625. Tomar 1 mL de la solución anterior y añadir 5.25 mL de caldo M-H, para obtener una concentración final de 100 µg/ 6.25mL.

A partir de la solución final del trimetoprim y de la solución final del sulfametoxazol, se realizan las diluciones 1:1.

DA-7867:

Pesar 0.128 gramos de DA-7867 y disolver en 10 mL de caldo M-H adicionado con cationes, para obtener una concentración final de 1280 µg/mL. Mezclar perfectamente.

APÉNDICE D

In Vitro Activities of New Quinolones and Oxazolidinones against *Actinomadura madurae*

Lucio Vera-Cabrera,^{1*} Elsa Y. Ochoa-Felix,^{1,2} Gloria Gonzalez,²
Rolando Tijerina,² Sung H. Choi,³ and Oliverio Welsh¹

Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario,¹ and Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León,² Monterrey, Nuevo León, México, and Research Laboratory, Dong-A Pharmaceutical Company, Limited, Yongin, Korea³

Received 20 June 2003/Returned for modification 12 November 2003/Accepted 25 November 2003

In this work, we studied the in vitro sensitivity of 24 strains of *Actinomadura madurae* to a new oxazolidinone (DA-7867), gatifloxacin, moxifloxacin, and garenoxacin by using a broth microdilution method. We observed that the *A. madurae* strains had a high level of sensitivity to all the antimicrobials tested. The most active drug was DA-7867, with a MIC at which 90% of the strains are inhibited (MIC₉₀) of 0.125 µg/ml and a MIC₅₀ of 0.06 µg/ml.

Mycetoma is a chronic subcutaneous infectious disease characterized by the tumefaction of the region affected and the production of cavitary abscesses which drain a seropurulent secretion containing the etiologic agent. This infectious disease can be produced by various causative agents that can be either true fungi or aerobic actinomycetes of the genera *Nocardia*, *Actinomadura*, or *Streptomyces* (14). Worldwide, about half of the cases are produced by eumycetes and half by bacteria, although the distribution of the species may vary from region to region, depending on local environmental conditions. Mycetoma cases caused by *Actinomadura madurae* or *Actinomadura pelletieri* have been reported in many regions of the world, particularly Venezuela, Senegal, West Bengal and Madras (India), and Mali (3, 6, 14). In Mexico, 10.2% of the total cases of mycetoma are produced by *A. madurae* (5). Although *A. madurae* has been isolated primarily from mycetoma lesions, it has also been found in sputum, blood, and brain samples (8).

Several drugs have been used in the treatment of mycetoma caused by *Actinomadura* species, including streptomycin, dapson, amikacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) (14). In our clinical dermatology department, we have used SXT in combination with amikacin, obtaining excellent results (13). However, these drugs have to be taken for several months, and in some persons they can produce serious side effects, such as ototoxicity or nephrotoxicity in the case of amikacin and hemolytic and aplastic anemia, urticaria, photosensitivity, etc., in the case of the sulfonamides. Recently, due to the development of global bacterial resistance, new and more potent antimicrobials have been developed, and we consider it important to evaluate their activity against this microorganism in order to have other therapeutic alternatives for the treatment of mycetoma caused by *A. madurae*.

In the present study, we assayed the sensitivity of 24 *A. madurae* strains isolated from patients with mycetoma to two

oxazolidinones (linezolid and DA-7867) and several quinolones, including gatifloxacin, moxifloxacin, and the recently developed quinolone garenoxacin (12). These antimicrobials were selected because of their reported activity against mycobacteria, nocardiae, or other gram-positive microorganisms (1, 2, 4, 10, 11). The activities of these compounds were compared to those of SXT and amikacin.

Linezolid was obtained from its manufacturers (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, Mich.); sulfamethoxazole, trimethoprim, and amikacin were obtained from Sigma Chemical Products (St. Louis, Mo.). DA-7867 was provided by Dong-A Pharmaceutical Company, Limited, Yongin-Si, Korea. Garenoxacin compound was donated by Bristol-Myers Squibb, and the other quinolones, gatifloxacin and moxifloxacin, were obtained from commercial sources.

We used the broth microdilution method that has been previously described (1, 11). Briefly, we utilized fresh colonies on Sabouraud dextrose agar (7-days old) to prepare the inoculum. A cellular suspension was prepared by placing two loopfuls of the bacterial culture in a glass test tube and grinding it to suspend part of the bacterial mass. The ground colonies were suspended in 1 ml of saline solution and diluted with cation-adjusted Mueller-Hinton broth until turbidity matched that of the McFarland 0.5 standard. This suspension was diluted to obtain a final concentration of approximately 1×10^4 to 5×10^4 CFU per well, and 0.1 ml 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 tested. For the control, we inoculated in the same way a well containing cation-adjusted Mueller-Hinton broth without the drug. After 3 days of incubation at 35°C, the plates were read and the MIC was determined as the lowest concentration of the drug totally inhibiting bacterial growth. The assays were run in triplicate. For the sulfonamides, we considered the MIC to be the lowest concentration that inhibits 80% of the growth compared to the amount of growth in the control well. As controls, we utilized *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptomyces aureus* ATCC 29213, and *A. madurae* ATCC 19425. All the antimicrobials except SXT were tested at

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



DONA O

