

Artículo original

Efectividad *in vitro* de vancomicinas genéricas expandidas en Venezuela, en cepas certificadas de los géneros *Enterococcus* y *Staphylococcus*

Lorena Abadía-Patiño^{a,*}, Beatriz Hidalgo^b, Saúl Mosqueda^c

^aLaboratorio de Resistencia Bacteriana, Departamento de Biomedicina, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente. ^bDepartamento de Bioanálisis, Núcleo Sucre, UDO, ^cDepartamento de Matemáticas Núcleo Sucre UDO. Venezuela.

Recibido 19 de febrero de 2019; aceptado 17 de septiembre de 2019

Resumen: El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la efectividad *in vitro* de vancomicinas genéricas distribuidas en el territorio nacional. Se estudiaron cinco marcas de vancomicina (Behrens, Fada Pharma, Vancocin®, Vancomax®, Celovan®). Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) por dos métodos así como la curva de muerte y se trataron de inducir mutantes. Se emplearon cepas certificadas de *Staphylococcus* (ATCC 25923, ATCC 29213, Mu50) y *Enterococcus* (ATCC 29212, V583) para todas las pruebas. Las CMI estuvieron dentro del rango teórico esperado de las cepas certificadas, excepto para *E. faecalis* ATCC 29212 que presentó una dilución por encima del valor teórico con Vancocin® por dilución en agar. Las bacterias presentaron el comportamiento esperado en la curva de muerte en presencia y ausencia de antibiótico, según sus perfiles de susceptibilidad. Se indujeron mutantes con la vancomicina Behrens y la cepa *S. aureus* ATCC 25923 a 2 mg/L y con todas las marcas de vancomicina con la cepa *S. aureus* Mu50 a 10 mg/L. En conclusión, las cinco marcas de vancomicina estudiadas presentan potencia microbiológica.

Palabras clave: efectividad; vancomicina; curva de muerte; mutantes.

In vitro effectiveness of generic vancomycin expended in Venezuela, on certified strains of *Enterococcus* and *Staphylococcus*

Abstract: The main objective of this work was to study the *in vitro* effectiveness of generic vancomycins distributed in the national territory. In this work we studied five vancomycin generics (Behrens, Fada Pharma, Vancocyn®, Vancomax®, Celovan®). The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by two methods, the curve of death and they were tried to induce mutants. Certified strains of *Staphylococcus* (ATCC 25923, ATCC 29213, Mu50) and *Enterococcus* (ATCC 29212, V583) were used for all tests. The MICs were within the expected theoretical range of the certified strains, except for *E. faecalis* ATCC 29212 that presented a dilution above the theoretical value with vancocyn by dilution in agar. Bacteria presented the expected behavior in the death curve in presence and absence of antibiotic, according to their susceptibility profiles. Mutants were induced with Behrens vancomycin and the *S. aureus* strain ATCC 25923 at 2 mg/L and with all vancomycins with *S. aureus* strain Mu50 at 10 mg/L. In conclusion, the five generic vancomycins studied here, have microbiological potency.

Keywords: effectivity; vancomycin; curve of death; mutants.

* Correspondencia:

E-mail: labadia@udo.edu.ve

Introducción

Los laboratorios farmacéuticos invierten grandes cantidades de dinero en el desarrollo de medicamentos debido a la implementación de pruebas para comprobar su efectividad, estabilidad, estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos en modelos experimentales. Una vez otorgada la certificación para su uso en humanos, el

medicamento puede al fin salir a la venta. Por todas estas razones, cuando una droga nueva sale al mercado, su costo es elevado. Las patentes de los medicamentos varían de 10 a 12 años, lo que significa que, durante ese período, no puede ser copiado, pero finalizado ese tiempo, cualquier laboratorio puede sintetizar esa molécula, a un costo mucho menor, debido a que no han invertido todo el dinero que invirtió el del laboratorio farmacéutico innovador [1].

Cuando se emplean antibióticos genéricos, es necesario demostrar que la equivalencia farmacéutica (identidad del principio activo, potencia, pureza, uniformidad de contenido, velocidad de disolución, etc.) se encuentra dentro de una escala aceptada respecto al innovador, para asumir la equivalencia terapéutica (bioequivalencia). Desde su aprobación por la Administración Federal de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) en 1958, vancomicina se ha utilizado como un antibiótico eficaz frente a bacterias grampositivas y, sobre todo, frente a cepas de *Staphylococcus* productoras de β -lactamasas; pero en el siglo pasado, el desarrollo de nuevos antibióticos, con menos efectos adversos, limitó su uso. La aparición en 1980, de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes, *Staphylococcus coagulasa-negativa* y *Enterococcus*, favoreció nuevamente el uso de vancomicina [2].

Para obtener un resultado exitoso debe existir una interacción específica entre el fármaco, el agente patógeno, el lugar de infección y el hospedero, además de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que, para vancomicina, varía en un amplio rango de 0,25 a >256 $\mu\text{g/mL}$ frente a diferentes patógenos. Los dos principios a considerar en la farmacodinamia son: el efecto post-antibiótico (EPA) y el tiempo de relación entre muerte bacteriana y concentración del antibiótico. Debido a que vancomicina es un fármaco dependiente del tiempo, su EPA es de moderado a prolongado, por lo que pueden surgir cepas resistentes durante el tratamiento. Tanto la farmacocinética como la farmacodinamia buscan cuantificar la actividad *in vivo* y garantizar la eficacia terapéutica [3].

Este estudio fue diseñado para evaluar el efecto *in vitro* de cinco marcas diferentes de vancomicina por medio de las concentraciones mínimas inhibitorias, tanto en agar como en microdilución en caldo; así como determinar las curvas de muerte con cepas bacterianas certificadas y, por último, determinar si hay inducción de mutantes bajo diferentes perfiles de susceptibilidad.

Materiales y métodos

Cepas de estudio: Las cepas bacterianas que se emplearon en esta investigación fueron: *E. faecalis* V583 (resistencia a vancomicina, fenotipo VanB, aislada de un hemocultivo en el hospital Barnes, en Saint Louis, Missouri, Estados Unidos en 1987), *S. aureus* Mu50 (susceptibilidad intermedia a vancomicina, aislada de secreción del esternón, de un paciente masculino de 4 meses, en el hospital universitario Juntendo, de Japón en 1996), además de las cepas de control de calidad, especificadas más adelante.

Antibióticos: Se probaron dos vancomicinas genéricas de semi-marca (Behrens, Fada Pharma) y tres genéricas de marca propia (Vancocyn®, Vancomax® y Celovan®) de diferentes casas comerciales, cuya presentación farmacéutica es vancomicina clorhidrato en polvo liofilizado.

CMI en agar: En placas de agar Müeller-Hinton (MH) suplementadas con diferentes concentraciones de

vancomicina (0,5-128 $\mu\text{g/mL}$), se incubaron con inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de las cepas *E. faecalis* (ATCC® 29212 y V583) y *S. aureus* (ATCC® 29213, ATCC® 25923 y Mu50), durante 24 horas a 35 °C. Los resultados se interpretaron siguiendo los criterios del manual M100-S25 [4].

CMI por microdilución en caldo: Se determinó la CMI en policubetas de plástico estériles de fondo redondo, con 100 μL de caldo MH. Se realizaron diluciones seriadas 1:20 a partir de las soluciones de trabajo de las diferentes vancomicinas de 2 $\mu\text{g/mL}$ (128 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Se añadieron 5×10^4 UFC/mL de los inóculos de las cepas *E. faecalis* (ATCC® 29212, V583) y *S. aureus* (ATCC® 29213, ATCC® 25923 y Mu50). Todas las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas, tras ese período los resultados se interpretaron siguiendo los criterios del manual M100-S25 [4].

Curva de muerte: Se determinó mediante el método de Krogstad-Mollering [5], modificado en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO). Las concentraciones de los antibióticos se seleccionaron en función de la CMI de cada una de las cepas controles. Por cada cepa se colocaron dos tubos, uno sin antibiótico (control de crecimiento) y uno con antibiótico (control de disminución de la población). En caldo BHI se colocó un inóculo 0,5 McFarland de las cepas en estudio. Las concentraciones de las vancomicinas empleadas fueron 2 $\mu\text{g/mL}$ para *E. faecalis* ATCC® 29212 y 32 $\mu\text{g/mL}$ para *E. faecalis* V583; 1 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* ATCC® 29213 y *S. aureus* ATCC® 25923 y 4 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* Mu50. Los tubos se incubaron a 35 °C en baño de María con agitación. Se midió la densidad óptica de cada cepa (con y sin antibiótico) por espectrofotometría en un espectrofotómetro JENWAY (modelo 6405-UV Visible), a una longitud de onda 600 nm a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas.

Inducción de mutantes con vancomicina: La inducción de mutantes se realizó por el método de Pfeltz con algunas modificaciones [6]. Las cepas de *S. aureus* ATCC® 25923 y Mu50 fueron subcultivadas en 4 mL de caldo BHI con 2 mg/L de vancomicina (con cada una de las marcas en estudio) en agitación (250 rpm) de 1 a 7 días a 35 °C hasta cuando se observó turbidez. Las colonias obtenidas fueron inoculadas en agar BHI con 2 mg/L de vancomicina (con la vancomicina que permitió el crecimiento). Se incubaron por 24 horas a 35 °C. Las colonias que crecieron en la placa, fueron subcultivadas en caldo BHI con una concentración mayor de vancomicina e incubadas de 1 a 7 días a 35 °C hasta cuando se observó turbidez. Los ciclos de cultivos en agar y en caldo fueron repetidos hasta alcanzar 16 mg/L de vancomicina (con la marca que permitió el crecimiento) [6]. Se contó el número de colonias totales en los cuatro cuadrantes de cada placa, se calculó la media y se multiplicó por el factor de dilución; con estos resultados se determinaron las UFC/mL, utilizando la siguiente fórmula

[7]:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{mL de muestra}}$$

Control de calidad: Las cepas utilizadas para el control de calidad fueron: *S. aureus* ATCC® 25923 (sensible a vancomicina, no productora de betalactamasa), *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 (sensible a vancomicina, productora de betalactamasa), y *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (sensible a vancomicina), según las tablas 2C y 2D del manual M100-S25 del CLSI [4].

Análisis estadístico: Los resultados de esta investigación se presentan en figuras y tablas. Además se realizó un análisis estadístico no paramétrico (Análisis de Varianza Bidimensional) para verificar la existencia o no de diferencias significativas con un nivel de significancia de 1% [8].

Resultados y discusión

Para elegir el tratamiento con vancomicina en infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus*, hay que determinar la CMI porque no hay puntos de corte por el método de difusión en disco, en el manual M100-S18 del CLSI, desde el año 2008, cosa que no ocurre con *Enterococcus*. En este estudio se usaron cinco vancomicinas genéricas (Behrens, Celovan®, Fada Pharma, Vancocyn® y Vancomax®), frente a cinco cepas con diferentes niveles de susceptibilidad, expresadas en la tabla 1. Todas las vancomicinas presentaron los valores teóricos esperados, excepto Behrens y Celovan®, únicamente con la cepa *E. faecalis* ATCC 29212, la cual fue mucho más sensible (0,5 µg/mL) (Tabla 1), lo cual confirma la potencia microbiológica (grado de inhibición) de los antibióticos analizados. *E. faecalis* ATCC® 29212 tuvo un valor de CMI (8 µg/mL) por dilución en agar para Vancocyn®, por encima del rango teórico (1–4 µg/mL). *E. faecalis* ATCC® 29212 presentó una dilución por debajo del rango establecido por el M100-S25 del CLSI, para la cepa certificada con las vancomicinas Behrens y Celovan®, en este estudio. La variación de una o dos diluciones por

encima o por debajo del valor teórico de las CMI (según el manual M100-S25 de CLSI), no es significativo, por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo no indican fracasos en las pruebas de laboratorio por el uso de vancomicinas genéricas. Al aplicar el Análisis de Varianza Bidimensional se determinó que no existen diferencias significativas ($p>0,01$) con intervalo de confianza de 1%, entre las cinco marcas de vancomicina utilizadas con respecto a las cinco cepas certificadas con los dos métodos usados; a pesar de ser el método de microdilución en caldo más sensible y específico que el otro.

Algunos investigadores sugieren que el método de elección debería ser el de microdilución en caldo, ya que se observan ligeros cambios con los otros métodos [9]. En un trabajo realizado en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela, se determinó la CMI a vancomicina por los métodos de microdilución en caldo y dilución en agar, en 14 cepas de *S. aureus* aisladas en pacientes de UCI y hemodiálisis. Por el método de dilución en agar, 12 cepas presentaron una CMI de 1 µg/mL y una de 2 µg/mL; pero por el método de microdilución en caldo, 12 presentaron CMI de 2 µg/mL y 2 cepas 4 µg/mL, demostrando que el método de microdilución en caldo es más sensible y específico que el de dilución en agar [10].

La curva de letalidad o muerte se emplea fundamentalmente para el estudio de nuevos antibióticos y para determinar el sinergismo o antagonismo de la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente; además de suministrar una información dinámica de la actividad bactericida y sobre la relación entre la concentración de antibióticos y su actividad microbicida [11,12]. Las diferentes marcas de vancomicina produjeron un descenso de la población bacteriana de la cepa *S. aureus* ATCC® 25923 (sensible a glicopéptidos) en la primera hora del tiempo de exposición; con este ensayo se demostró la efectividad bacteriológica de las vancomicinas *in vitro* (Datos no mostrados). Con la cepa *S. aureus* ATCC® 29213, se observó un descenso o muerte de la población a la primera hora del tiempo de exposición con vancomicina, a excepción de Celovan® con la cual la inhibición bacteriana se visualizó desde el inicio de la exposición con el antibiótico (Datos no mostrados).

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria por microdilución en caldo de cepas certificadas con las cinco vancomicinas genéricas en estudio.

Cepas	CMI en caldo (µg/mL)					
	Valor teórico	Behrens ^f	Vancocyn® ^g	Vancomax® ^h	Celovan® ⁱ	Fada Pharma ^j
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5-2 ^a	2	2	2	2	2
<i>S. aureus</i> Mu50	4-8 ^b	4	4	4	4	4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1-2 ^c	1	1	1	1	2
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1-4 ^d	0,5	1	1	0,5	1
<i>E. faecalis</i> V583	4-1000 ^e	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria; ATCC: American Type Culture Collection; a, c, d): origen del valor teórico de la cepa según CLSI; b) Hiramatsu *et al.*, 1997; e) Courvalin, 2005, f) México, g) India, h) Argentina, i) India, j) Argentina.

Lankalapalli *et al.* [13] probaron vancomicina genéricas y el innovador, utilizando la cepa *S. aureus* ATCC® 29213, encontrando que las concentraciones bactericidas y bacteriostáticas resultaron como se esperaba, evidenciándose que no hay diferencias *in vitro* entre los genéricos y el innovador; al igual que lo observado en este trabajo. En la figura 1, se confirma la sensibilidad de la cepa *E. faecalis* ATCC® 29212 frente a las diferentes marcas de vancomicina en estudio, observándose disminución de la población bacteriana a la primera hora del tiempo de exposición. Con la vancomicina de Behrens, hubo efecto bactericida desde el inicio de exposición de la bacteria al antibiótico. Con respecto a la curva de muerte empleando las cepas *S. aureus* Mu50 (con susceptibilidad disminuida a vancomicina) y *E. faecalis* V583, se observó crecimiento exponencial similar cuando la bacteria se expuso a las vancomicinas genéricas (Figura 2) tanto en presencia como en ausencia de antibiótico; lo cual sugiere una expresión constitutiva del mecanismo de resistencia presente en esa cepa, ya que en ningún momento la población fue diezmada ante la presencia del antibiótico. El problema de la susceptibilidad disminuida a vancomicina, es que se generan subpoblaciones resistentes a bajo nivel en poblaciones totalmente sensibles; al eliminar la población sensible el paciente presentará una ligera mejoría, pero cuando la población resistente comience a crecer y a colonizar el espacio que antes estaba ocupado por la sensible tendrá recaídas en su evolución clínica.

En un trabajo realizado sobre la eficacia terapéutica de vancomicina frente a cepas *S. aureus* MR30 y MR33 resistente y sensible a metilicina, para el tratamiento de neumonía experimental, la cepa MR30 permaneció estable a una concentración igual a su CMI; sin embargo, a 2x y 4x

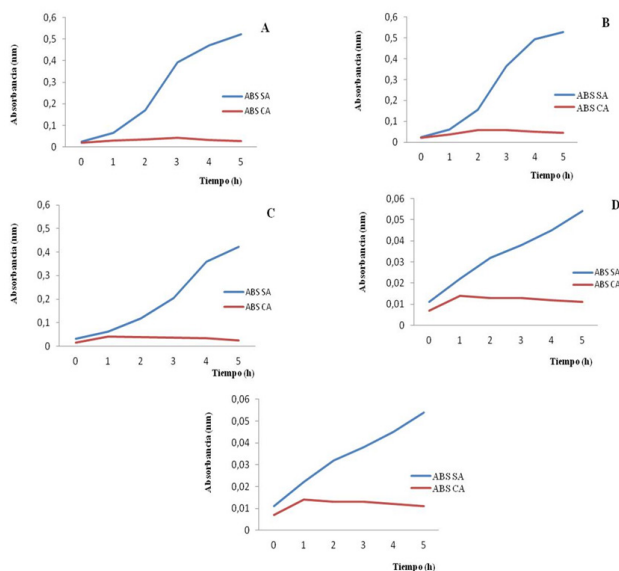


Figura 1. Curvas de muerte de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 frente a vancomicinas genéricas (Behrens, Celovan®, Fada Pharma, Vancocyn® y Vancomax®). A: Behrens, B: Vancocyn®, C: Vancomax®, D: Celovan®, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin antibiótico, CA: Con antibiótico, h: hora.

CMI mostraron una actividad bactericida entre las 8 y las 24 horas [14]. Por el contrario, en este estudio, se produjo incremento de la población bacteriana a la primera hora de exposición con vancomicina (Figura 2).

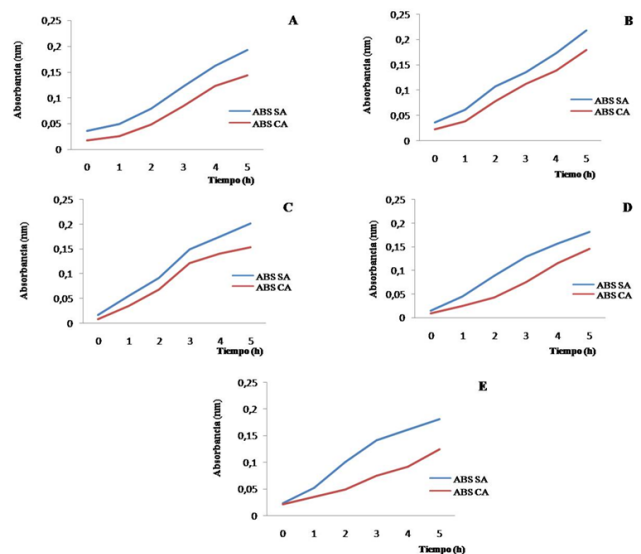


Figura 2. Curvas de muerte de la cepa *S. aureus* Mu50 con resistencia intermedia frente a vancomicinas genéricas (Behrens, Celovan®, Fada Pharma, Vancocyn® y Vancomax®). A: Behrens, B: Vancocyn®, C: Vancomax®, D: Celovan®, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin antibiótico, CA: Con antibiótico, h: hora.

Con respecto a la prueba de inducción de mutantes con las diferentes marcas de vancomicina, la única que indujo mutaciones fue la de Behrens, en la cepa *S. aureus* ATCC® 25923 a una concentración de 2 mg/L a las 24 horas. No obstante, al exponer nuevamente la cepa en estudio a una concentración de 3 mg/L con las cinco marcas de vancomicina, solo la vancomicina Fada Pharma indujo mutantes en un promedio de $5,6 \times 10^{-8}$ UFC/mL (Datos no mostrados). La inducción de mutantes se caracteriza por un período de exposición, con un inóculo elevado de la bacteria en cuestión (10^{10} células), al antimicrobiano a una concentración por debajo de la concentración preventiva de mutantes (PMC, por sus siglas en inglés) pero por encima de la CMI, teóricamente en este período pueden aparecer bacterias resistentes al antibiótico. Obtener niveles superiores a PMC del fármaco sería fundamental durante el tratamiento, para evitar la selección de cepas mutantes resistentes [15].

En la tabla 2 se muestra el crecimiento bacteriano de *S. aureus* Mu50 a las 24 horas con una concentración de 10 mg/L de las diferentes marcas de vancomicina (Behrens, Celovan®, Fada Pharma, Vancocyn® y Vancomax®), lo cual indica la inducción de mutantes de la cepa en estudio. Además, la cepa *S. aureus* Mu50 también se expuso a concentraciones de 12, 14 y 16 mg/L de vancomicina, observándose crecimiento en las diferentes concentraciones con las cinco vancomicinas. Sin embargo, se observó que al aumentar las concentraciones de vancomicina disminuía el surgimiento de mutantes expresados en UFC/mL, lo cual

Tabla 2. Inducción de mutantes de la cepa *S. aureus* Mu50 a una concentración de vancomicina de 10 mg/L.

Vancomicinas	UFC/mL
Behrens ^a	4,9x10 ⁻⁸
Vancocyn ^{®b}	1,7x10 ⁻⁸
Vancomax ^{®c}	6x10 ⁻⁸
Celovan ^{®d}	8,6x10 ⁻⁷
Fada Pharma ^e	3,2x10 ⁻⁸

(a) México, (b) India, (c) Argentina, (d) India, (e) Argentina.

es lógico, a mayor concentración de antibiótico, menor probabilidad de supervivencia. En trabajo realizado por Pfeltz *et al.*, se evaluó un total de doce cepas de *S. aureus* que fueron sometidas a vancomicina para obtener mutantes durante el tratamiento; seis cepas adquirieron el fenotipo esperado rápidamente, dos lentamente y cuatro fracasaron en el desarrollo de mutaciones para obtener el fenotipo VISA (susceptibilidad intermedia a vancomicina). Las CMI de las cepas VISA estaban en un rango comprendido de 4 a 16 mg/L y no revirtieron su sensibilidad perdida en 20 pasajes no selectivos [6]. La estabilidad de los mutantes aquí obtenidos no fue evaluada. Las cepas que fracasaron en la obtención de mutantes fueron sensibles a metilicina, igual a lo informado por Pfeltz [6]. Otros investigadores han reportado mutantes, pero con una exposición mayor a la presentada en este estudio y con cepas resistentes a metilicina [16]. Al aplicar el Análisis de Varianza Bidimensional en la prueba de inducción de mutantes para la cepa *S. aureus* Mu50 se determinó que no hubo diferencias significativas ($p > 0,01$), con un intervalo de confianza de 1% entre las cinco vancomicinas (Behrens, Celovan[®], Fada Pharma, Vancocyn[®] y Vancomax[®]), empleadas con respecto a la cepa antes mencionada. Los ensayos para la inducción de mutantes en este estudio, pudieron haber fallado al no haber tomado en cuenta mayor cantidad de cultivos paralelos, debido a las limitaciones económicas actuales. Ya que mientras mayor sea el número de cultivos, mayor será la probabilidad de que las bacterias desarrollen células mutadas en presencia del antibiótico; hay un estimado de 20 a 30 cultivos paralelos diarios para aumentar la posibilidad de obtención de mutantes *in vitro* [17].

Conclusión

Se concluye que las cinco marcas de vancomicina estudiadas presentan potencia microbiológica frente a las cepas certificadas con las pruebas *in vitro* realizadas; sin embargo, se sugiere realizar ensayos clínicos con estas vancomicinas, porque la equivalencia farmacéutica no implica equivalencia terapéutica.

Referencias

- Bera A, Mukherjee A. The importance of generic drugs in India. *Int J Pharm Chem Biol Sci.* 2012; 2:575-87. Disponible en: <https://www.ijpcbs.com/files/volume2-4-2012/22.pdf>. Acceso 15 de octubre 2018.
- Griffith RS. Introduction to vancomycin. *Rev Infect Dis.* 1981; 3(Suppl 2):S200-4. Doi: https://doi.org/10.1093/clinids/3.Supplement_2.S200.
- Saravolatz LD, Pea F, Viale P. The antimicrobial therapy puzzle: could pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships be helpful in addressing the issue of appropriate pneumonia treatment in critically ill patients? *Clin Infect Dis.* 2006; 42:1764-71. Doi: <https://doi.org/10.1086/504383>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth information supplement. Document M100-S25. Wayne Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Krogstad D, Moellering R. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine.* Second edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1986. p. 537-78.
- Pfeltz RF, Singh VK, Schmidt JL, Batten MA, Baranyak CS, Nadakavukaren MJ, Jayaswal RK, Wilkinson BJ. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:294-303. Doi: <https://doi.org/10.1128/aac.44.2.294-303.2000>.
- Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23:99-139. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-09>.
- Siegel S, Castellán NJ. Estadística no paramétrica, aplicada a las ciencias de la conducta. 4a. edición. México. Editorial Trillas; 1995.
- Kruzel MC, Lewis CT, Welsh KJ, Lewis EM, Dundas NE, Mohr JF, Armitage LY, Wanger A. Determination of vancomycin and daptomycin MICs by different testing methods for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:2272-3. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.02215-10>.
- Abadía-Patiño L, Acuña S, Manosalva I. Estudio de la susceptibilidad a vancomicina de cepas de *Staphylococcus* spp., aisladas del hospital Antonio Patricio de Alcalá, Cumaná, estado Sucre. *Saber.* 2017; 29:169-73.
- Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, Miègeville A, Donnio P, Bugnon D, Potel G. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51:857-64. Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg160>.
- Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirtliff

- ME. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infect Immun.* 2006; 74:3415-26. Doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.00392-06>.
13. Lankalapalli S, Tenneti VSVK, Nimmali SK. Design and development of vancomycin liposomes. *Indian J Pharm Educ Res.* 2015; 49:208-15. Doi: <https://doi.org/10.5530/ijper.49.3.6>.
 14. Docobo-Pérez F. Tratamientos de la neumonía experimental por *Staphylococcus aureus*: estudios de eficacia terapéutica de cotrimoxazol, cloxacilina, linezolid y vancomicina frente a cepas *S. aureus* sensible y resistente a meticilina. (Tesis Doctoral). Sevilla, España: Universidad de Sevilla; 2009. Disponible en: <https://idus.us.es/handle/11441/24363>. Acceso 2 de noviembre 2018.
 15. Firsov AA, Smirnova MV, Lubenko IY, Vostrov SN, Portnoy YA, Zinner SH. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an *in vitro* dynamic model. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58:1185-92. Doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkl387>.
 16. Liu LG, Zhu YL, Hu LF, Cheng J, Ye Y, Li JB. Comparative study of the mutant prevention concentrations of vancomycin alone and in combination with levofloxacin, rifampicin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Antibiot.* 2013; 66:709-12. Doi: <https://doi.org/10.1038/ja.2013.87>.
 17. Asteris G, Sarkar S. Bayesian procedures for the estimation of mutation rates from fluctuation experiments. *Genetics.* 1996; 142:313-26. Disponible en: <https://www.genetics.org/content/genetics/142/1/313.full.pdf>. Acceso 15 de noviembre 2018.